

Arja Kiema

Proteiinit biomimeettisissä komposiittimateriaaleissa ja niiden biotekninen tuotto homeessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

19.11.2013

ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Teknologian tutkimuskeskus VTT:ssä, nanobiomateriaali-ryhmässä. Haluan kiittää erikoistutkija Géza Szilvayta kokeellisen ja kirjallisen työn ohjauksesta. Haluan kiittää myös tiimipäällikkö Riitta Partasta, professori Markus Linderiä sekä erikoistutkija Harry Boeria mahdollisuudesta suorittaa opinnäytetyöni VTT:llä. Kiitokset kuuluvat myös tohtori Markku Saloheimolle ja tohtori Nina Arolle tuesta hometransformaatioissa ja -kasvatuksissa. Lisäksi haluan kiittää lehtori Tiina Soinista opinnäytetyöhön liittyvistä neuvoista ja ohjeista kirjoitusvaiheen aikana.

Espoossa 28.10.2013

Arja Kiema

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Arja Kiema Proteiinit biomimeettisissä komposiittimateriaaleissa ja niiden biotekninen tuotto homeessa 52 sivua + 3 liitettä 19.11.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Erikoistutkija Géza Szilvay Lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää nanokomposiittimateriaaleissa käytettävien fuusioproteiinien tuottamista homeisännässä. Fuusioproteiinien konstruktio koostuivat materiaaleihin sitoutuvista yksiköistä sekä materiaalin joustavuuteen vaikuttavista yksiköistä.</p> <p>Geenien kloonauksia suoritettiin käyttämällä yhden reaktion Golden Gate -menetelmää ja konstruktio transformoitiin partikkelipommituksella <i>Trichoderma reesei</i> -homeeseen. Fuusioproteiinit tuotettiin solusta erittyvinä ja solun sisäisesti tuotettuna eri tilavuuksissa ja erilaisia kasvatusalustoja käyttäen. Proteiinien puhdistusta varten selvitettiin erilaisia menetelmiä kuten liukoisuuskäsittelyä, kaksifaasiuuttoa, preparatiivista käänteisfaasikromatografia ja affiniteettikromatografia. Analysointiin käytettiin SDS-PAGE-ajoa, Western blot -analyysiä, korkean erotuskyvyn nestekromatografia-ajoa ja matriisiavusteista laserdesorption/ionisaatio -määritystä.</p> <p>Työssä saatiin aikaan halutut geenikonstruktio ja homeetransformantit, jotka tuottivat tutkitavaa fuusioproteiinia. Proteiinien tuottotasot jäivät kuitenkin melko alhaisiksi, ja näytteissä oli havaittavissa proteaasipilkkoutumista. Eri menetelmiä käyttäen onnistuttiin puhdistamaan ja analysoimaan fuusioproteiinit. Proteiinien alhaisten tuottotasojen vuoksi puhdistaminen käytetyillä menetelmillä osoittautui haastavaksi. Solun sisäisesti tuotettu resiliiniyksikön sisältävä konstruktio todettiin parhaaksi tuottumisen ja puhdistumisen osalta.</p> <p>Tutkimusta jatketaan selvittämällä erilaisten materiaalisovelluksiin käytettävien proteiinkonstruktien tuottamista homeessa sekä niiden vaikutusta materiaalien mekaanisiin ominaisuuksiin.</p>	
Avainsanat	biotekninen tuotto, elastinen proteiini, Golden Gate, partikkelipommitus, <i>Trichoderma reesei</i> , kaksifaasiuutto

Author Title Number of Pages Date	Arja Kiema Proteins in Biomimetic Composite Materials and Their Biotechnology Production in Filamentous Fungi 52 pages + 3 appendices 19 November 2013
Degree	Bachelor in Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Géza Szilvay, Senior Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The aim of the thesis was to study the expression of fusion proteins used in nanocomposite materials in fungal host. The fusion protein constructs contained material binding domains and elastic domains.</p> <p>Gene cloning was performed using the single reaction Golden Gate -method. Transformation of the fungus <i>Trichoderma reesei</i> was achieved by DNA-coated small particles and micro projectile bombardment. The fusion proteins were secreted to the culture medium or expressed intracellularly in various volumes and using different culture mediums. Purification of the proteins was studied by solubility assays, aqueous two-phase system extraction, reversed-phase chromatography and affinity chromatography. Methods used for the analysis were SDS-PAGE, western blotting, high performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization.</p> <p>In the study, the planned gene constructs and fungal transformants expressing the target proteins were achieved. However, the expression yields were rather low and protein degradation was observed. The fusion proteins were purified and analyzed using various methods. Purification of proteins proved to be challenging because of the low expression levels. Expression of fusion protein containing a resilin unit intracellularly was most successful in terms of expression levels and purification.</p> <p>The focus of future studies will be on the production of different material specific fusion proteins in fungi and the impact of these proteins on the mechanical properties of the materials they form.</p>	
Keywords	the biotechnology production the elastic protein, Golden Gate, particle bombardment, <i>Trichoderma reesei</i> , aqueous two-phase system

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Biomimeettiset nanokomposiittimateriaalit	1
2.1	Adhesiiviset proteiinit	2
2.1.1	Hydrofobiiniproteiinit	3
2.1.2	Selluloosaan sitoutuvat domeenit	4
2.2	Elastiset proteiinit	5
2.2.1	Resiliiniproteiini	5
2.2.2	GB1-domeeni	6
2.3	Proteiinit biomimeettisissä komposiittimateriaaleissa	7
3	Biotekninen tuotto ja puhdistus	8
3.1	Tuotto-organismit	10
3.1.1	Tuotto prokaryooteissa	11
3.1.2	Tuotto aitotumallisissa eukaryooteissa	11
3.2	Transformaatio	14
3.3	Tuotetun proteiinin puhdistus	17
4	Materiaalit ja menetelmät	20
4.1	Elastisten proteiinikonstruktioiden kloonauk	21
4.2	Hometransformaatio	24
4.3	Transformanttien valinta	24
4.4	Yhdistelmäproteiinien tuotto homeessa	26
4.4.1	Erittävien yhdistelmäproteiinien tuotto	27
4.4.2	Yhdistelmäproteiinien tuotto solun sisälle	28
4.5	Yhdistelmäproteiinien eristys ja puhdistus	28
4.5.1	Liukoisuuskokeilut ja käsittelyt	28
4.5.2	Kaksifaasiuutto eri detergenttejä käyttäen	29
4.5.3	Affiniteettikromatografiapuhdistus	30
4.5.4	Preparatiivinen käänteisfaasinestekromatografia-ajo	30
4.6	Yhdistelmäproteiinien analysointi	31
4.6.1	Proteiinien geelielektroforeesi	31

4.6.2	Western blot -analysointi	31
4.6.3	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-ajo	32
4.6.4	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio-määritys	32
5	Tulokset	33
5.1	Kloonaus	33
5.2	Hometransformaatio	34
5.3	Tuotto	37
5.3.1	Erittyvä proteiinituotto	37
5.3.2	Solun sisäinen proteiinituotto	39
5.3.3	Erittyvän ja solun sisäisen proteiinituoton vertailu	40
5.4	Pienen mittakaavan puhdistuskokeet	41
5.4.1	Solun sisäisesti tuotetun proteiinin liukoisuuskoe ja käsittelyt	42
5.4.2	Kaksifaasiuutto	43
5.5	Preparatiivinen puhdistus ja analysointi	43
5.5.1	Erittyvän proteiinin puhdistus ja analysointi	44
5.5.2	Solun sisäisesti tuotetun proteiinin puhdistus ja analysointi	46
5.5.3	Erittyvän ja solun sisäisesti tuotetun puhdistuksen vertailu	48
6	Yhteenveto ja loppupäätelmät	50
	Lähteet	53
	Liitteet	
	Liite 1. Affiniteettikromatografia-ajot DBCD-resiliini-HFBI ja DSCBD-resiliini-HFBI-ER	
	Liite 2. MALDI-ajo DCBD-resiliini-HFBI-ER	
	Liite 3. MALDI-ajo DCBD-resiliini-HFBI	

Lyhenteet

ACN	asetonitriili
AGE	agaroosigeelielektroforeesi
<i>AmdS</i>	<i>Aspergillus nidulas</i> asetamidaasi
ATPS	Kaksifaasiuutto, engl. Aqueous two-phase system extraction
CBD	Selluloosaan sitoutuva domeeni, engl. Cellulose-binding domain
CBH	Sellobiohydraasi, engl. Cellobiohydrolase
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
ER	Endoplasmakalvosto
GB1	G-proteiinin B1 -domeeni
<i>gpdA</i>	<i>Aspergillus nidulas</i> glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi -promootori
HFB	Hydrofobiini
hph	hygromysiinifosfotransferaasi
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia, engl. High-performance liquid chromatography
Kan	Kanamysiini
LSB	Laemmli-puskuri
MALDI	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio
NEB	New England Biolabs
NFC	Nanoselluloosa
PCR	Polymeraasiketjureaktio
PDA	Perunan dekstroosi ravintoagar, engl. Potato dextrose agar
PEG	Polyetyleeniglykoli
RPC	Käänteisfaasinestekromatografia, engl. Reverse phase chromatography
SBTI	Soijapavun trypsiini-inhibiittori, engl. Soybeans trypsin inhibiittori
SDS	Natriumdodesyyilisulfaatti
SDS-PAGE	SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
TEV	TEV-proteaasi, engl. Tobacco Etch Virus
TFA	Trifluorietikkahappo, engl. trifluoroacetic acid
TOF	Lentoaikamassaspektrometri, engl. Time of flight

1 Johdanto

Biologiassa on evoluution aikana kehittynyt eliöiden toiminnan kannalta erinomaisia rakenteita ja materiaaleja. Koska, viime vuosikymmenien aikana luonnon resurssien vähenemisen myötä on ilmennyt lisääntyvää tarvetta uusille luonnonvaroja säästävillä materiaaleille, niin luontoa ja luonnon ratkaisuja tarkkailemalla halutaan etsiä uusia innoituksen lähteitä. Valmistetut biomimeettiset komposiittimateriaalit ovat synteettisiä, kahdesta tai useammasta aineksesta valmistettuja, luonnon mekanismien jäljittelyn tuloksia. [1.]

Tämä opinnäytetyö pohjautuu aikaisempaan työhön, jossa kehitettiin biomimeettinen komposiittimateriaali. Kahden proteiiniyksikön yhdistelmän, eli fuusioproteiinin, oli havaittu kykenevän bioadhesiivisten domeeniensa kautta kiinnittymään grafeenilevyihin ja nanoselluloosakuituihin ja yhdistämään ne keskenään nanokomposiittimateriaaleiksi. Fuusioproteiini koostui grafeeniin sitoutuvasta hydrofobiiniproteiinista (HFBI) sekä kahdesta selluloosaan sitoutuvasta domeenista (DCDB). [2.]

Opinnäytetyön tutkimuksen kohteena oli nanokomposiittimateriaaleissa käytettävien fuusioproteiinien tuotto homeisännässä. Erityisesti tavoitteena oli tuottaa proteiineja, joilla on molekyyllitason joustavuutta ja joilla voidaan vaikuttaa lopullisen materiaalin lujuusominaisuuksiin.

Tavoitteena oli kahden erilaisen konstruktion valmistaminen ja tuottaminen. Konstruktiot koostuvat edellä mainituista kahdesta selluloosaan sitoutuvasta domeenista ja hydrofobiiniproteiinista. Näiden yksikköjen väliin kloonattiin joustavuutta antava yksikkö, joko resiliini- tai GB1 -domeeni.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Teknologian tutkimuskeskus VTT:ssä, nanobiomateriaali ryhmässä, Suomen Akatemian rahoittamassa Super-Fibre-projektissa.

2 Biomimeettiset nanokomposiittimateriaalit

Biomimeettiset materiaalit ovat synteettisiä materiaaleja, joissa luonto on ollut innoittajana ja luonnossa esiintyvät materiaalit sekä mekanismit ovat olleet jäljittelyn kohteena. Materiaalien valmistuksessa on tärkeä ymmärtää, mikä on rakenteiden ja toiminnan

suhde, joten tutkimuksen kohteena on ollut myös materiaalien toiminnan mukautumiskyvyn hallinta. Ala on nopeasti kasvava, sisältäen valtavasti mahdollisuuksia, ja muutamana viime vuosikymmenenä luontoa kopioimalla on kehitetty useita monitoiminnallisia materiaaleja. Esimerkkeinä ilmiöistä, jotka ovat olleet mallina synteettisiin vastineisiin, ovat lootuksen lehtien hydrofobisuus, gekkojen jalkojen tarttumiskyky ja perhosten siipien fotonikiteet. [3.] Muita esimerkkejä ovat simpukan helmiäinen ja luumateriaalit [1].

Komposiitilla tarkoitetaan kahden tai useamman toisiinsa liukenemattoman materiaalin yhdistelmää. Komposiitteja valmistettaessa ainekset yhdistyvät yhdeksi rakenteeksi, jossa aineosat säilyvät erillisinä myös lopputuotteessa. Tavoitteena on yhdistää ja säilyttää materiaalien hyvät ominaisuudet. Perinteisesti komposiiteilla tarkoitetaan ihmisen valmistamia komposiitteja, kuten lasi- ja hiilikuitulujitetut (metallia, puuta, kiveä, keramiikkaa, hiili- ja lasikuitua tai muovihartseja) komposiitit. [4.] Nanokomposiittitermiä käytetään nanokokoluokan aineosia sisältävistä komposiittimateriaaleista. Luonnossa tavataan erilaisia komposiitteja, kuten esimerkiksi puu, joka on selluloosan ja ligniinin yhdistelmä, sekä simpukan helmiäinen, joka on muodostunut epäorgaanisten kalsiumkarbonaattikiteiden, orgaanisen kitiinikuitujen ja proteiinien yhdistelmästä. [1; 5.]

Komposiitit mahdollistavat erilaisten ominaisuuksien, kuten jäykkyyden, lujuuden ja sitkeyden yhdistymisen samassa rakenteessa. Komposiitteja voidaan muotoilla paremmin kuin perinteisiä materiaaleja, ja niillä on usein hyvä kemiallinen kestävyys. Niiden rakenteessa yleensä yksi komposiitin materiaaleista muodostaa matriisin, johon muut materiaalit sitoutuvat. Tuloksena on matriisin ja vahvistuskomponentin yhteisvaikutus. Vaikeutena komposiittimateriaalien valmistuksessa on komponenttien välisen rajapinnan yhteensovittaminen ja mahdollisen hylkimisen estäminen. [4; 6.]

2.1 Adhesiiviset proteiinit

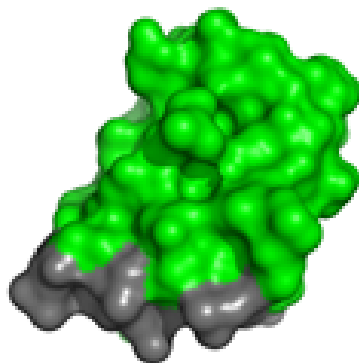
Proteiineja, jotka sitoutuvat materiaalien pinnalle, kutsutaan bioadhesiivisiksi proteiineiksi [7]. Kiinnittymällä biologisten rakenteiden pintoihin, ne voivat kontrolloida materiaalien rajapintaa, sen kasvua ja materiaalien vuorovaikutuksia. Proteiinit voivat vahvistaa materiaaleja ristikkoittamalla yhdistettäviä komponentteja. Adhesiivien vuorovaikutukset voivat olla Van der Waals -voimia, vetysidoksia sekä hydrofobisia ja sähköstaattisia vuorovaikutuksia. [8.]

Bioadhesiiviset polymeerit ovat luonnosta peräisin olevia makromolekyyliä, kuten ge-latiini ja tärkkelys, ja ne sitoutuvat biologisiin kudoksiin ja materiaaleihin. Bioadhesiivisia proteiineja löytyy luonnossa esimerkiksi meren nilviäisistä ja äyriäisistä, joissa simpukan parran adhesiiviproteiini ja merirokon liimaproteiini saavat eliot tarttumaan kasvualustaansa. [2.] Esimerkkejä ovat myös selluloosaan kiinnittyvä domeeni (engl. cellulose-binding domein, CBD) [9] ja hydrofobiini, joka kiinnittyy hydrofobisiin materiaaleihin kuten grafeeniin [10; 11].

2.1.1 Hydrofobiiniproteiinit

Hydrofobiinit ovat pieniä, noin 10 kDa:n eli 70–130 aminohapon kokoisia rihmasienten tuottamia proteiineja. Ne ovat pinta-aktiivisia, ja niillä on kyky itsejärjestäytyä hydrofiilisten ja hydrofobisten aineiden, kuten esimerkiksi veden ja ilman välisille rajapinnoille. Järjestäytymisessä muodostuu kestävä amfipaattinen kalvo näiden kahden erilaisen faasin välille. Hydrofobiinit muodostavat hydrofobisen kalvon rihmasienten hyyfien eli rihmojen pinnalle ja lisäksi alentamalla veden pintajännitystä mahdollistavat itiöemien kasvun ilmaan. [12; 13; 10.]

Hydrofobiinit jaetaan kahteen luokkaan proteiinien ominaisuuksien ja rakenteen perusteella [14]. Luokkaan I kuuluvien proteiinien muodostamat kalvot ovat veteen liukene-mattomia ja vaativat liuottamiseensa voimakkaita kemikaaleja, kuten trifluoroetikka-happoa tai muurahaishappoa. Sen sijaan luokan II proteiinit ovat hyvin vesiliukoisia ja niiden muodostamat kalvot voidaan liuottaa detergenteillä tai 60-%:sella etanolilla. Hydrofobiinit ovat proteiinirakenteeltaan hyvin kestäviä ja ne selviävät keittämisestä dena-turoimatta. [15.] HFBI on *Trichoderma reesei* -homeen tuottamaa luokan II hydrofobiini [16; 17]. Niiden rakenteessa kahdeksan kysteiini-aminohappotähteen muodostamaa rikkisiltaa stabiloivat proteiinia voimakkaasti. Ne ovat amfifiilisiä molekyylejä, joissa on sekä hydrofobinen että hydrofiilinen osa [10: 17; 18] (kuva 1).

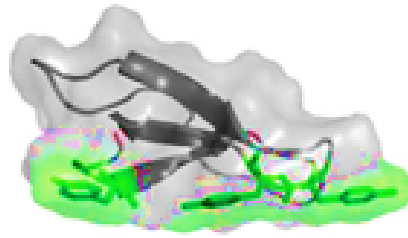


Kuva 1. Hydrofobiiniproteiinin HFBI:n kolmiulotteinen rakenne. Vihreällä on kuvattu proteiinin hydrofiilinen pinta ja harmaalla hydrofobinen pinta. Hydrofobinen osa sitoutuu hydrofobisille pinnoille. (Kuva: Géza Szilvay)

Hydrofobiinien ominaisuutta sitoutua hydrofobisille pinnoille, kuten grafeenin ja puhtaan piin pinnalle, voidaan käyttää hyväksi näiden pintojen muokkaamisessa ja funktionalisoinnissa [11; 2]. Proteiineja voidaan hyödyntää lääketieteellisissä ja teknisissä soveluksissa [19; 20]. Lisäksi pinta-aktiivisuutensa perustuen hydrofobiineja voidaan käyttää avuksi kaksifaasiuutto-puhdistuksessa. Proteiini pystyy muuttamaan fuusioproteiinin hydrofobisuutta ja aikaansaamaan sen siirtymisen ionisoimattoman detergentin muodostamaan faasiin. [17.] Tämä menetelmä kuvataan tarkemmin kappaleessa 2.2.4.

2.1.2 Selluloosaan sitoutuvat domeenit

Useimmat selluloosaa hajottavat sellulaasientsyymit, kuten *T. reesei* -homeen tuottama sellobiohydraasi (CBH), muodostuvat kahdesta domeenista. Osat ovat isompi katalyyttinen domeeni sekä pienempi kiilamaisen muotoinen selluloosaan sitoutuva domeeni (engl. cellulose-binding domain, CBD). CBD tuo kiinteän, hajotettavan selluloosan lähemmäksi entsyymin aktiivista osaa [21]. Sellulaasientsyymin amino- tai karboksyyli päässä sijaitseva CBD on noin 40 aminohapon kokoinen peptidi. Niiden disulfidisidosten lujittama, jäykkä rakenne on sama kaikilla sellulaaseilla, joita tuotetaan monissa aerobisissa ja anaerobisissa bakteereissa ja homeissa. Domeenit jaetaan 10 eri luokkaan, joista I-, II- ja III -luokka ovat yleisempiä. Selluloosan hajotuksessa CBD:n aromaattiset ryhmät sitoutuvat selluloosan sokrerirenkasiin (kuva 2). Kun kaksi CBD-yksikköä yhdistetään lyhyellä peptidillä eli ns. linkkerillä, on yhdistelmän todettu sitoutuvan yksittäistä yksikköä paremmin selluloosaan. [22; 23; 9.]



Kuva 2. Selluloosaan sitoutuva domeenin (CBD) kolmiulotteinen rakenne. Selluloosaan sitoutuva osa on kuvattu vihreällä. (Kuva: Géza Szilvay)

2.2 Elastiset proteiinit

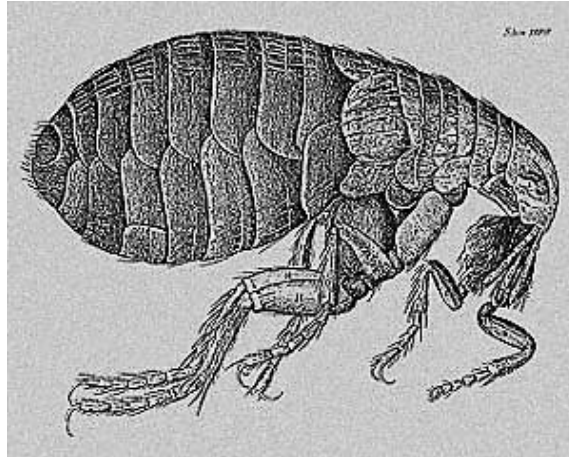
Luonnossa esiintyy useita elastisia eli joustavuutta aikaansaavia proteiineja, esimerkiksi selkärankaisten lihaksissa ja sidekudoksessa titiini-, elastiini- ja fibrilliiniproteiinit. Elastisia proteiineja sisältävät myös nisäkkäiden suuret valtimot, kuten sydämen aortta sekä ulkokorvassa ja kurkunkannessa sijaitsevat kimmorustosolut, joiden soluväliaineessa on elastisia säikeitä. Myös nilviäisten parran säieproteiini ja abductinproteiini, hyönteisten resiliini, vehnän gluteeni sekä hämähäkin silkkiproteiini ovat elastisia proteiineja. [24; 25.]

Elastisia ominaisuuksia ovat joustavuus ja sitkeys. Proteiinien toistorakenteet sekä niiden väliset ristosilloitukset vakauttavat rakennetta. Ne saavat proteiinin venytyksessä avautumaan toistojen kohdalta ja mahdollistavat muutoksia alkuperäisestä tilanteesta ja palautumisen murtumatta takaisin. [26; 6.] Elastiset proteiinit voivat käyttäytyä rakenteesta riippuen, joko jousen tai iskunvaimentimen kaltaisesti, tai näiden yhdistelmänä. Seuraavassa käsitellään kahta elastista proteiinia.

2.2.1 Resiliiniproteiini

Elastisiin proteiineihin kuuluva resiliini löydettiin 1960-luvulla tutkittaessa hyönteisten lentomekanismia [29]. Resiliini on polymeerin kaltainen, kumimainen, pehmeä proteiini. Sitä on luonnossa eläinten osissa, joissa vaaditaan joustavuutta ja alhaista jäykkyyttä sekä rasituksen sietoa ja tehokasta liike-energian varastointia [30]. Resiliinin elastisuus on pitkäkestoista, sekä sallii myös nopeat muutokset rasituksen tasossa [31]. Resiliini

venyy 3–4 -kertaiseen pituuteen, ja palautuu takaisin muotoonsa katkeamatta. Sillä on tärkeä asema kirppujen (kuva 3) hyppimismekanismeissa [32, s. 3; 33] ja kaskaiden äänen muodostuksessa [34].



Kuva 3. Kirppu, jonka hyppimisominaisuudelle resiliini on tärkeä proteiini [35].

Venytettäessä resiliinin entropia pienenee, koska ketjulla on vähemmän liikkumismahdollisuutta. Muodostunut konformaatio on energialtaan epäedullinen rakenne ja siksi palautuu alkuperäiseen sykkyrämaiseen muotoon. [26] Tätä mekanismia kutsutaan entropiseksi jouseksi. Banaanikärpäsen (*Drasophila melanogaster*) resiliinigeeni koostuu toistuvasta hydrofiilisestä GGRPSDSYGAPGGGN-aminohapposekvenssistä, jonka osat ovat kovalenttisesti liitetty yhteen tyrosiini-aminohappotähteellä [36].

2.2.2 GB1-domeeni

Immunoglobuliinin sitoutumisdomeeni B1 (GB1) on osa *streptokokki*-bakteerin G-proteiinia. GB1 sitoo kaikkia neljää ihmisen IgG-immunoglobuliinia [37]. GB1 on pieni 56 aminohappotähteen muodostama domeeni, jonka sekundäärirakenne koostuu alpha-heliksistä ja neljästä beta-juosteesta, jotka ovat sijoittuneet kuvan 4 mukaisesti [38]. GB1-domeenin tehtävänä on auttaa bakteeria torjumaan isäntäorganismien immuunipuolustusta.

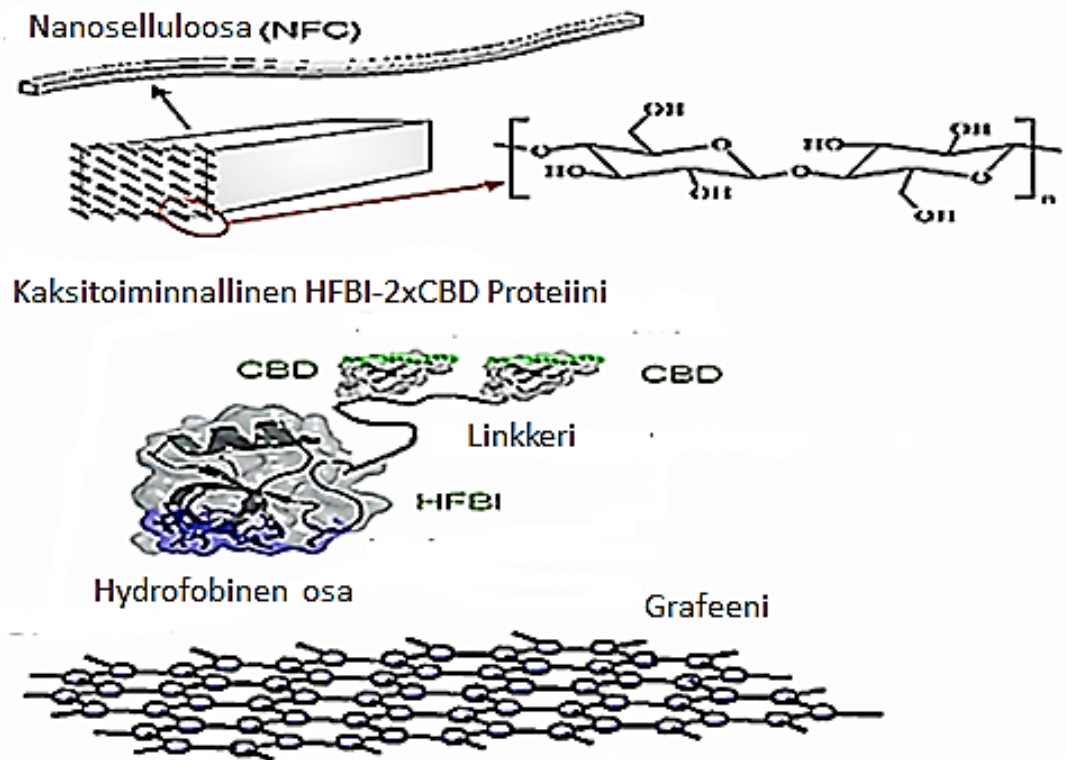


Kuva 4. G-proteiini B1 -domeenin rakenne. Neljä β -juostetta ovat pareittain vastakkaisuuntaisia muodostaen kaksi silmänäularakennetta, joita α -heeliksi yhdistää. (Kuva: Géza Szilvay)

GB1:llä on havaittu olevan hyviä mekaanisia ominaisuuksia, jotka eivät liity sen luonnolliseen toimintaan. Useista GB1-domeeneista muodostetun polyproteiini polyGB1:n havaittiin käyttäytyvän kuten elastomeerinen proteiini. Tällä proteiinilla on iskua vaimentavia ominaisuuksia ja se aukeaa hitaasti ja toimii siksi toisella tavalla kuin jousimainen resiliiniproteiini. Resiliinistä poiketen, sillä ei ole kimmoisia ominaisuuksia vaan GB1-polyproteiini kykenee muuttamaan liike-energian lämmöksi. Venytettäessä sen vetysidokset katkeavat ja muodostavat rakenteen uudelleen palautuessa. Mekaanisia ominaisuuksia ovat nopea laskostuminen ja alhainen mekaaninen väsyminen toistuvien venytysten ja vapautusten aikana. [39.]

2.3 Proteiinit biomimeettisissä komposiittimateriaaleissa

Proteiinien hyödyntäminen komposiittimateriaaleissa on vielä harvinaista, mutta niiden tutkimus kehittyy ja joitakin esimerkkejä on olemassa. Hydroksypatiitti-mineraalista ja hämähäkin silkkiproteiinista muodostettu silkki-keraamikomposiitti sekä M13 bakteeriviruksen päälliproteiinin ja hydroksypatiitin muodostama komposiittimateriaali [6] ovat tuotettuja esimerkkejä. Hydrofobiinin ja CBD:n toiminnallisuutta on hyödynnetty komposiittimateriaalien valmistuksessa. Näistä proteiineista muodostettu kaksitoiminnallinen fuusioproteiini sitoutuu liitettävien materiaalien välille muodostaen komposiittimateriaalin. [6.] (Kuva 5) Fuusioproteiinin osoitettiin kykenevän sitomaan yhteen grafeeni-levyjä sekä nanoselluloosakuituja. Muodostunut rakenne muistuttaa luonnossa esiintyvää simpukan helmiäisen tiiliseinärakennetta.



Kuva 5. Kuvan keskellä oleva fuusioproteiini HFBI-DCBD, jossa hydrofobiini (HFBI) kiinnittyy sen alla olevaan grafeeniin ja selluloosan sitoutuvat domeenit (CBD:t) sitoutuvat kuvan yläosassa olevaan nanoselluloosaan. Linkkeri sitoo HFBI-DCBD:n yksiköt kiinni toisiinsa [Lähdettä 6 mukaillen].

Elastisten proteiinien käytöstä materiaaleissa on esimerkkinä verisuonien korjauksen tukikehikko, jossa proteiineja on käytetty komposiittimateriaalina osana kollageenin ja fibrinin kanssa [27]. On myös tutkittu uutta polymeeriyhdistelmäateriaalia, joka on elastisen proteiinin ja silkin yhdistelmä [28].

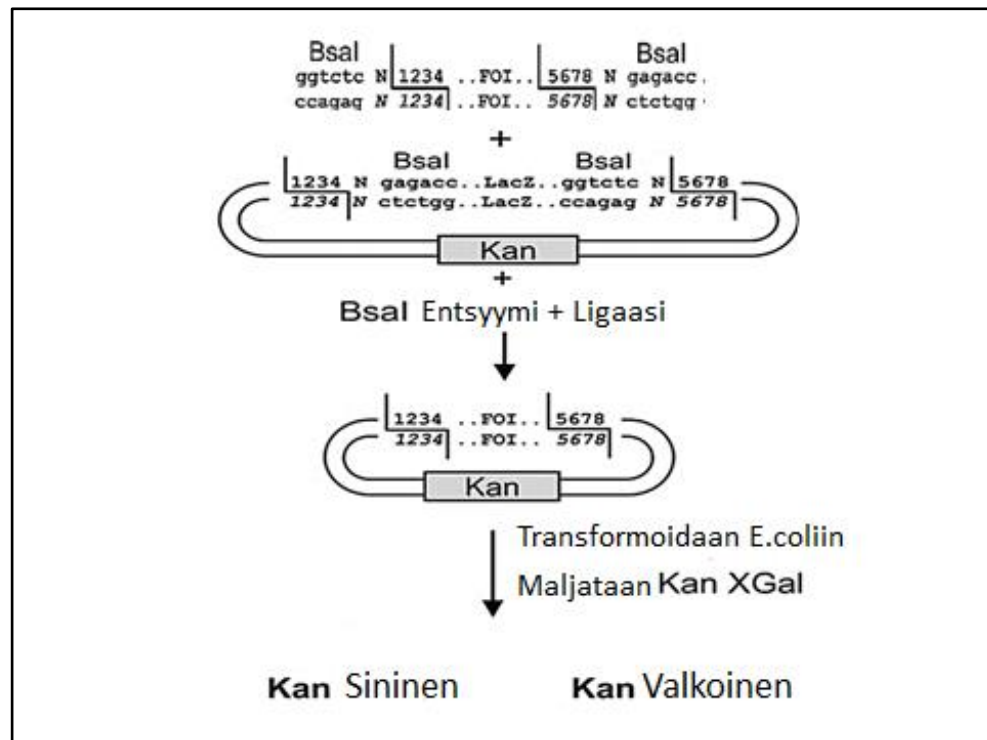
3 Biotekninen tuotto ja puhdistus

Biotekniikka on eri tieteiden välinen tieteenala, jossa käytetään hyväksi soluja, solujen osia sekä organismeja. Biotekniikkaa on perinteisesti hyödynnetty hiivan ja bakteerien aineenvaihduntatuotteissa. Bioteknisiä menetelmiä on käytetty mm. oluen ja viinin sekä hapatettujen maitotuotteiden, juuston ja leivän tuotannossa. Yhdistelmä-DNA-tekniikan ja nisäkässolujen kasvatustekniikoiden kehittyminen on ollut ratkaisevaa tieteenalan kehityksessä. Biotekniikalla voidaan organismeissa tuottaa myös sellaisia tuotteita, ne eivät voi tuottaa luontaisesti eli heterologisia tuotteita. Rekombinanttiproteiinien tuotta-

miseen lääketieteelliseen ja teollisuuden tarpeeseen on jatkuvasti kasvava tarve. [32, s. 12–19.]

Golden Gate -kloonausmenetelmä

Kloonauksen helpottamiseksi ja nopeuttamiseksi on kehitetty uusia menetelmiä, kuten Golden Gate -kloonausmenetelmä, joka perustuu tyyppin IIS restriktioentsyymien käyttöön. Entsyymi katkoo DNA-juosteen tunnistamiskohtansa ulkopuolelta, perinteisesti käytetyistä restriktioentsyymeistä poiketen. Yleisesti käytetyn IIS-tyypin restriktioentsyymien *BsaI*:n katkaisussa jää sekvenssin 5'- ja 3'-päihin neljän emäksen kohesiiviset päät eli yksisäikeiset hännät, joita voidaan käyttää hyväksi osien ligaatiossa. Synteettisesti valmistettua inserttiä käytettäessä sen sekvenssi voidaan valmistaa niin, että restriktioentsyymien tunnistuskohta jää katkaisussa ulkopuolelle, ja inserttiin jää vain kohesiiviset päät. Nämä kohesiiviset päät voidaan vapaasti suunnitella niin, että vain yksi geenin kopio pystyy kiinnittymään ligaatiossa. Katkaistu vektori ei voi insertin puuttuessa ligoitua itsensä kanssa. Yhdessä putkessa voidaan samanaikaisesti digestoida ja ligoida lämpötilaohjauksessa. Kuvan 6 mukaisesti vektori ja siirrettävä geeni sisältävät kaksi *BsaI*:n restriktiokohtaa, jotka ovat komplementaarisia keskenään. Vektori sisältää antibiootti-selektiomarkkerin ja β -galaktosidaasiin perustuva α -komplementaatio-seulontamenetelmän. Selektioita käyttämällä mahdolliset väärät vaihtoehdot seuloutuvat pois. [40.]



Kuva 6. Golden Gate -menetelmän mukainen kloonaustrategia. FOI on siirrettävä geeni ylimpänä olevassa kuvassa. Sen alla on ekspressiovektori, jossa on *LacZ*- ja kanamysiini-selektiogeenit. *BsaI* on käytetty restriktioentsyymi. Alinna on yhdistelmävektori, joka transformoidaan bakteerisoluihin ja maljataan kanamysiiniä ja X-gal:a sisältäville maljoille. Värireaktion perusteella (α -komplementaatio) löydetään oikeat pesäkkeet [Lähdettä 40 mukaillen].

3.1 Tuotto-organismit

Proteiinin tuottomenetelmän valinta on tärkeää oikean tuloksen saavuttamiseksi, ja jokaisen käytettävän menetelmän hyvät ja huonot puolet pitää punnita tapauskohtaisesti. Valintaan vaikuttavat proteiinin käyttökohde, määrän tarve, tuottamiseen kuluva aika, kustannukset ja kasvatuksen vaativuus. Myös tuoton skaalattavuus ja eettiset kysymykset ovat tärkeitä valintakriteereitä. Rekombinanttiproteiinien tuottosysteemejä on kehitetty bakteereissa, hiivoissa, homeissa, eläin-, hyönteis- ja kasvisoluissa sekä myös eläimissä, hyönteisissä ja kasveissa. Tuottosolun ominaisuudet vaikuttavat transformaatioissa käytettävän vektorin valintaan, sekä promootorin ja replikaation aloituskohdan täytyy olla solulle ominaisia. Translaation jälkeiset proteiinin muokkaukset, eli glykolysointi, fosforylointi, sulfididostosten muodostuminen ja proteiinin laskostuminen ovat eri tuottomenetelmillä erilaisia. Proteiinin tuottamisessa on myös tärkeää valita, erittykö proteiini sisälle soluun vai solun ulkopuolelle. [41; 42.]

3.1.1 Tuotto prokaryooteissa

Heterologisten, eukaryoottiperäisten proteiinien tuotto bakteerisoluiissa on yleisesti valittu menetelmä, ja prokaryooteista *Escherichia coli* ja *Bacillus subtilis* ovat eniten käytettyjä tuottoisäntiä. *E. coli* -bakteeri on genetiikaltaan hyvin tunnettu ja proteiinit saadaan tuotettua sellaisten plasmidien avulla, joiden geneettinen manipulointi on helppoa ja kopioluku saadaan korkeaksi. Käytössä on myös useita ja tehokkaan tuoton mahdollistavia promoottoreita. Prokaryoottien kasvu on tehokasta ja se mahdollistaa proteiinituoton suurina määrinä sekä edullisina tuottohintoina. Huonona puolena on translaation jälkeisten muokkausten puuttuminen. Bakteerien pelkistävissä olosuhteissa tuotetun proteiinin laskostuminen on ongelmallista, koska siinä vaadittavat rikkisillat eivät pysty muodostumaan. Tuotettaessa proteiinia suurina määrinä muodostuu myös inkluusiokappaleita, joissa proteiinit eivät ole aktiivisia eivätkä vesiliukoisia ja vaativat uudelleen laskostumisen palautuakseen toiminnallisiksi. Prokaryoottisoluiissa tuotetaan yleensä pienempiä proteiineja, koska isoja proteiineja saadaan tuotettua huonommin. [41; 43.]

3.1.2 Tuotto aitotumallisissa eukaryooteissa

Hiivat

Yksisoluiset hiivat kuuluvat sieniin ja ovat olleet bioteknisesti tärkeitä leivin- ja oluthiivan käytössä. *Saccharomyces cerevisiae* - ja *Pichia pastoris* -hiivoissa tuotetaan proteiineja erilaisilla kasvualustoilla taloudellisesti ja suurina solutiheyksinä. Hiivoissa pystytään tuottamaan suurempia vierasproteiineja, ja ne ovat sopivia isäntäorganismeja proteiineille, jotka tarvitsevat translaation jälkeistä muokkausta. Hiivasolut pystyvät suorittamaan suurimman osan translaation jälkeisistä muokkauksista sekä proteiinin laskostumisen nisäkässolujen lailla, mutta osa monimutkaisista translaation jälkeisistä toiminnoista puuttuu tai on erilaista, kuten pidemmät sokeriketjujen lisäykset. [43.] Hiivoja voidaan käyttää elintarviketeollisuuden lisäksi teollisuusentsyymien ja lääketeollisuuden tuotteiden valmistukseen sekä vasta-aineiden, aminohappojen, orgaanisten happojen, vitamiinien ja bioetanolin tuotossa [44, 9.1.6.2–9.1.6.3].

Homeet

Monisoluiset rihmasienet eli homeet ovat itiöitä muodostavia heterotrofeja, jotka eivät pysty itse tuottamaan tarvitsemaansa energiaa. Tuottoisäntinä on käytetty esimerkiksi

Aspergillus-, *Penicillium*- ja *Trichoderma* -sukuja. Homeita on pitkään käytetty elintarviketeollisuudessa juustojen makuaineiden tuotossa sekä pesuaine-, rehu- ja tekstiiliteollisuudessa entsyymien tuotossa. Soijakastikkeen, antibioottien, lääkeyhdisteiden ja orgaanisten happojen tuottaminen homeiden avulla, kuuluvat niiden biologisiin soveluksiin. Homeiden tärkeät ominaisuudet ovat kyky hajottaa monimutkaisia luonnonpolymeerejä ja tuottaa rakenteeltaan monimuotoisia erityysaineenvaihduntatuotteita. Tuoton edullisuus fermenttorikasvatuksessa perustuu halpoihin hiilen- ja typenlähteisiin. [32, s. 42; 44, 11.4.] Homeissa translaation jälkeiset muokkaukset ovat nisäkässolujen kaltaisia ja ne kykenevät laskostamaan tuotetut proteiinit. Ne eivät hiivan tavoin tuota hyperglykosylointia, mutta niiden glykosyloinnissa on nisäkässoluihin verrattuna eroja. [47.] Homeille ominaista on tuoton jatkuminen, vaikka niiden kasvu on pysähtynyt.

T. reesei (suvullinen muoto on *Hypocrea jecorina*) on mesofiili, ei-patogeeninen kotelosieni, joka on alun perin löydetty Toisen maailmansodan aikaan Salomonsaarilta [44, 11.4]. Villikannasta on mutaatioita käyttäen valmistettu tutkimuksissa käytettyjä homekantoja. *T. reesei* -homeella on kyky erittää suuria määriä selluloosaa hajottavia sellulaasientsyymejä, kuten cellobiohydraasia (CBH) [46]. Homeessa on homologista sellulaasiproteiinia tuotettu jo pitkään teollisessa mittakaavassa, kuten elintarviketeollisuudessa sekä puunjalostus- ja tekstiiliteollisuudessa. Sellulaaseja voidaan tuottaa myös esimerkiksi selluloosan hajottamiseksi bioetanolin tuotossa [44, 11.4]. Homologisia proteiineja voidaan tuottaa suuria määriä, vahvan promootorin säätelmänä, useita geenikopioita käyttäen [47].

Koska home pystyy suorittamaan translaation jälkeisiä muokkauksia, sen avulla voidaan tuottaa myös kompleksisia rekombinanttiproteiineja. Proteiinia voidaan tuottaa homekasvatuksessa suurina fermenttorikasvatuksina, jolloin kasvatukset ovat helppoja ja halpoja proteiinituottajia. Heterologisien proteiinien tuoton parantamiseksi tuotettavan proteiinin geeni voidaan liittää isäntäsolun oman promootorin säätelyn alaiseksi [48]. Tuotettavan proteiinin liittäminen kantajageeniin myös parantaa tuottotasoa [49]. Tuoton ongelmana on proteiinien heikko tuottotaso johtuen niiden laskostumisesta, glykosyloitumisesta tai proteolyttisestä hajoamisesta. Ongelmana on myös isännän ja tuotettavan geenin DNA-erot. Proteiinien hajoamisen estämiseksi tulisi isäntäkannan erittämät proteaasientsyymit poistaa tai estää niiden toiminta inhibiittorien lisäyksellä. Proteaasiongelmien ratkaisemiseksi on käytettyjä homekantoja parannettu mutaatitekniikoilla. [47; 43.] Tuotetut heterologiset proteiinit ovat esimerkiksi hormoneita, sytokiiniä (interleukiini-6), vasta-aine Fab-fragmentteja ja vasikan kymosiiniä [50].

Homologisia ja heteroloogisia proteiineja voidaan tuottaa solun sisäisesti tai solunulkoisesti erittyvänä. Erittyvän tuoton etuna on proteiinin helppo jatkokäsittely. Haittoina on yllä mainittu isäntäsolun proteaasien aiheuttama proteiinien hajoaminen ja mahdollinen alhainen tuotto eksogeenisten proteiinien eritysprosessista johtuen. Solun sisäisessä tuotossa etuna on proteaasiongelmien väheneminen ja tuotteen konservoituminen, mutta proteiinien ylituotto voi kuitenkin olla isäntäsolulle myrkyllistä. [51.] Tuotto-organismia valitessa bakteerin, hiivojen ja homeiden etuna on, ettei niiden tuottokäytössä ole eettisiä ongelmia.

Eläinsolut, siirtogeeniset eläimet ja hyönteissolut

Eläinsoluviljelmällä pystytään tuottamaan suuria nisäkäsproteiineja, jotka vaativat tietyn translaation jälkeisen muokkauksen, kuten farmaseuttisia proteiineja. Eläinsolujen viljelyminen on hitaampaa, kalliimpaa ja hankalampaa kuin bakteerien, hiivojen ja homeiden. Yleisesti käytettyjä nisäkässolulinjoja ovat hamsterin CHO-solulinja (engl. Chinese hamster ovary) ja BHK-solulinja, (engl. baby hamster kidney). Siirtogeenisissä eläimissä pystytään tuottamaan rekombinanttiproteiinia, kuten lääkeproteiinia, esimerkiksi maidossa tai veressä. Siirtogeenisinä eläiminä on käytetty lammasta, vuohta, hiirtä ja kanaa. Rekombinanttiproteiineja on tuotteina esimerkiksi maidossa, munan valkuaisessa ja veressä. [43; 32, s. 174–179.] Hyönteissolut pystyvät tuottamaan proteiineja suuria määriä verrattuna nisäkässoluihin. Ne kykenevät monimutkaiseen translaation jälkeiseen muokkaukseen, nisäkässolujen tapaan. Rekombinanttiproteiinien tuotossa hyönteissoluissa bakulovirus on yleisin käytetty vektori. [52.]

Siirtogeeniset kasvit ja kasvisolut

Siirtogeenisissä kasveissa tuotettava proteiinin voidaan ohjata siemeniin, lehtiin tai hedelmiin. Maissi ja tupakka ovat yleisesti käytetyt tuottokasvit. Kasvisoluissa tapahtuu eukaryoottien translaation jälkeisiä muokkauksia. Proteiinien tuotossa käytetään kasviviruksen DNA:sta muunneltua vektoria tai *Agrobacterium*-bakteerin Ti-plasmidi-vektoria. Kasvisoluja on helppo viljellä bioreaktoreina suuria määriä, ja niiden tuottaminen on halvempaa ja nopeampaa kuin eläinsoluja. Kasvisoluissa voidaan tuottaa esimerkiksi rokotteita, kasvutekijöitä tai kasvien sekundääriaineenvaihduntatuotteita. [32, s. 173–180; 47.] Eri proteiinituottosysteemejä on vertailtu taulukossa 1.

Taulukko 1. Rekombinantituottosysteemien vertailu [Lähdettä 52 mukailien].

	<i>E. coli</i>	Hiivat	Homeet ^a	Hyönteis-solut	Eläinsolut	Kasvit ^b
Kasvu	Hyvin nopea	Nopea	Nopea	Hidas	Hidas	Hidas
Tuottotaso (kui-vapaino)	Korkea	Korkea	Korkea	Hyvin korkea	Hyvin alhainen	Hyvin alhainen
Tuottavuus	Hyvin korkea	Korkea	Korkea	Korkea	Alhainen	Kohtalainen
Kasvatusalustan hinta	Hyvin alhainen	Alhainen	Alhainen	Korkea	Hyvin korkea	Hyvin alhainen
Kasvatustekniikat	Hyvin helpot	Helpot	Helpot	Vaikeat	Hyvin vaikeat	Kohtalaiset
Tuoton hinta	Hyvin alhainen	Alhainen	Alhainen	Korkea	Hyvin korkea	Korkeat
Proteiinin las-kostuminen	Kohtalainen	Hyvä	Hyvä	Kiitettävä	Kiitettävä	Kiitettävä
Yksinkertainen glykosylointi	Ei	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Monimutkainen glykosylointi	Ei	Ei	Kohtalainen	Kyllä ^c	Kyllä	Kyllä
Sekreetio	Heikko	Hyvä	Erinomainen	Kiitettävä	Kiitettävä	Heikko
Tuotettujen eu-karyoottiproteiinien toiminnallisuus	Heikko	Hyvä	Hyvä	Kiitettävä	Kiitettävä	Kiitettävä
Geneettisten tekniikoiden mahdollisuus	Erinomainen	Hyvä	Hyvä	Kohtalainen	Kohtalainen	Kohtalainen

^a Suullinen keskustelu; Nina Aro^b Suullinen keskustelu; Jussi Joensuu^c Eroaa eläinsolujen glykosyloinnista.

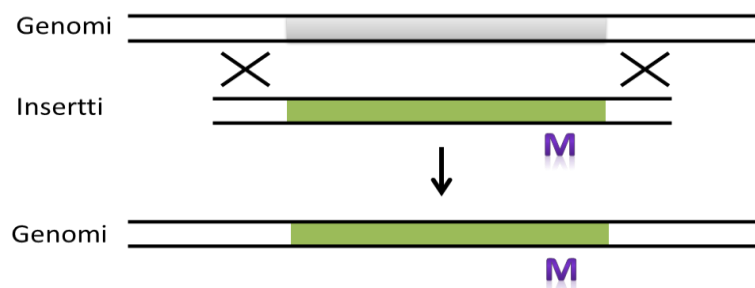
3.2 Transformaatio

Transformaatiossa siirretään geneettistä materiaalia DNA-molekyylien välityksellä solusta tai organismista toiseen. Geenien siirrossa käytettävät tuottovektorit sisältävät kaikki geenien toimintaan tarvittavat osat. Geeninsiirtovektori on usein niin kutsuttu sukkulavektori, joka kykenee replikoitumaan kahdessa tai useammassa isäntälajissa.

Samaa vektoria voidaan esimerkiksi käyttää ensin tuotettavan geenin kloonamiseen bakteerissa ja sitten sen transformaatioon homeeseen. [53, s. 74–88.] Transformaatiomenetelmiä on runsaasti erilaisia, ja ne riippuvat käytettävästä tuotto-organismista.

Hometransformaatio

Hometransformaatiossa tuotettavan geenin siirtäminen isäntäsoluun voidaan suorittaa erillisenä replikoituvana plasmidina tai siirrettävä DNA voidaan integroida homeeseen (kuva 7). Integroituminen voi olla homologista, eli suunnattua, tai ei-homologista, eli satunnaista liittymistä isännän genomiin. [54.] Integraatioon perustuvassa hometransformaatiossa tuottokasetti eristetään vektorikantajasta ja tuotettava geeni integroidaan esimerkiksi *T. reesei* -homeen genomiin. Kasetti voidaan liittää homeen *cbh1*-geenin alueeseen, tuottokasetin *cbh1*-geenin alueiden avulla, jolloin kohdeproteiinin tuottoa säätelee *cbh1*-geenin promoottori. *T. reesei* -homeen bioteknisessä käytössä hyödynnetään sen kykyä erittää suuria määriä sellobiohydraasientsyymiä. Integroitu geeni replikoituu isäntäsolun kromosomin osana.



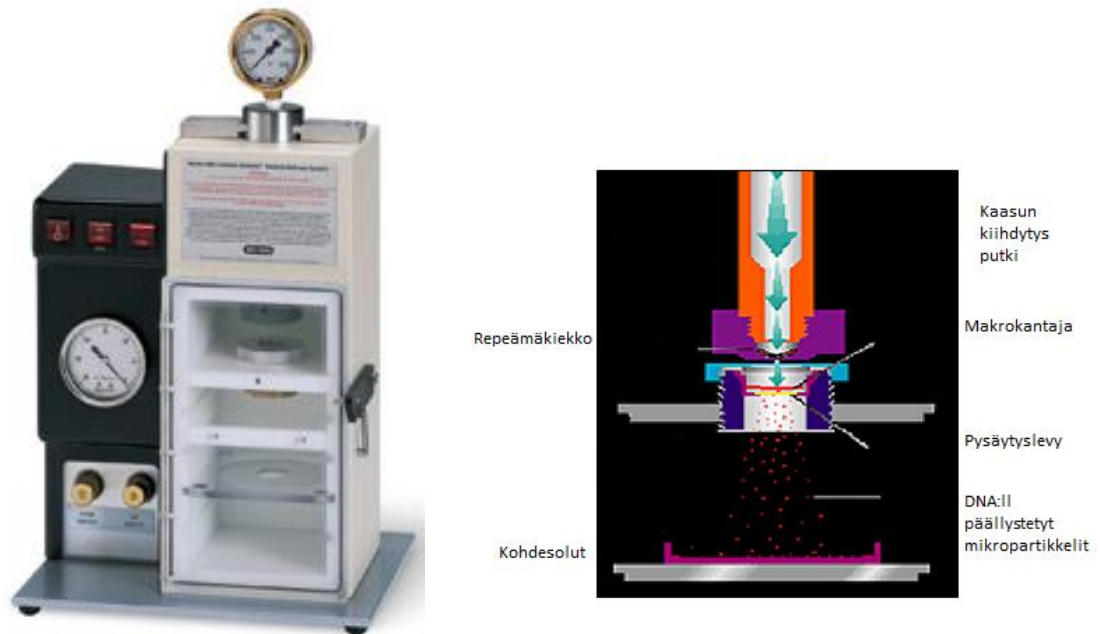
Kuva 7. Homologinen rekombinaatio homologisten alueiden (X) avulla. Kuvassa ylimmäisenä isäntäorganismien genomi ja sen alla siirrettävän insertin geeni. Alimmaisena uusi muodostunut genomi, joka sisältää selektiivisen M-geenin [Lähdettä 55 mukaillen].

Transformanttien seulomiseksi transformoimattomista soluista selektiomaljoilla tarvitaan merkki- tai selektiogeeni. Tutkittava ja selektioon tarvittava geeni voidaan viedä homeeseen samassa molekyylissä tai erillisissä molekyyleissä. Merkkigeeninä voidaan käyttää esimerkiksi *Aspergillus nidulans* -asetamidaasigeeniä (*amdS*), jonka avulla home pystyy kasvamaan asetamidi ainoana typenlähteenään [56]. Selektiona voidaan käyttää hygromysin B aminoglykosidi -antibioottia, joka inhiboi prokaryoottien, eukaryoottien ja nisäkässolujen proteiinisynteesiä. Tuotettavaan geeniin lisätynä antibioottiresistenssi *hph*-geeni mahdollistaa kasvun maljoilla, joihin on lisätty hygromysiiniä. [57.]

Hometransformaatiossa käytettävät protoplastit valmistetaan usein suvuttomista itiöistä tai tuoreesta myseelistä. Menetelmässä solujen soluseinä pilkotaan entsyymaattisella käsittelyllä, esimerkiksi Novozyme 234 -entsyymiseoksella tai Zymolaasientsyymillä. Protoplastit stabiloidaan osmoottisesti sorbitolilla, NaCl:lla tai MgSO₄:lla. DNA:n lisäyksessä *T. reesei* -homeen solumembraanit saadaan läpäiseväksi polyetyleeniglykolilla (PEG), CaCl₂:lla ja Tris-HCl:lla. Transformaation jälkeen protoplastit muodostavat uuden soluseinän ja kasvavat myseeliksi. [58.]

Transformaatio voidaan suorittaa myös sähkövirralla, joka tekee soluseinään mikroskooppisia reikiä, joista transformoitava DNA pääsee sisään protoplasihin [59]. Myös *Agrobacterium tumefaciens* -maaperäbakteerin Ti-plasmidia voidaan käyttää protoplastien transformointiin. *Agrobacterium*-välitteistä transformointia on käytetty myös *T. reesei* -homeen transformaatiossa [60.]

Näiden transformaatiomenetelmien lisäksi geeninsiirto voidaan suorittaa partikkelipommituksella. Stanford julkaisi ensimmäisen partikkelipommitusmenetelmän vuonna 1987 [61], ja siinä pommituskohteena olivat sipulin suurikokoiset solut. Menetelmä on yleisesti käytössä siirtogeenisten kasvien tuottamiseksi. Partikkelipommitus on käytökelpoinen menetelmä monien solujen, kudosten ja soluorganellien, kuten myös *T. reesei* -homeen transformointiin [62]. Siirrettävä geneettinen aineisto peitetään kulta- tai volframi-mikropartikkeleilla, joiden avulla se pommitetaan suoraan soluseinän läpi kohdesoluihin. Menetelmässä pommitus tapahtuu seuraavalla tavalla: partikkeliin kiinnitetty DNA pipetoidaan makrokantajan päälle ja asetetaan vakuumikammiossa muovisen repeämäkiekon alle. Näiden alapuolelle asetetaan pysäytyslevy ja kohdesolut. Korkea-paineinen heliumkaasun nopea pulssi saa aikaan purkauksen, jossa repeämäkiekko rikkoutuu ja työntää mikropartikkelit DNA:n kanssa pysäytyslevyä päin. Repeämäkiekko ei voi läpäistä pysäytyslevyä, mutta mikropartikkelit jatkavat matkaa niiden alle asetettuihin soluihin (kuva 8). Menetelmässä optimoitavat olosuhteet kohdemateriaalille ovat käytetty DNA-määrä, mikropartikkelien etäisyys repeämäkiekkoon, mikropartikkelien koko, heliumkaasun paine ja vakuumi. [63; 64.]



Kuva 8. Partikkelipommituslaite Bio-Rad PDS-1000/Helium solujen tai kudosten transformaatioon ja havainnoiva kuva partikkelipommituksesta [Lähdettä 65 mukaillen].

3.3 Tuotetun proteiinin puhdistus

Homesoluissa proteiineja voidaan tuottaa solunsisäisesti tai solun ulkopuolelle erittyvinä. Proteiinien solunsisäisessä tuotossa solut hajotetaan tai niiden seinämiä käsitellään tuotteen ulos saamiseksi. Hajotusmenetelmiä on mekaanisia sekä ei-mekaanisia, ja niiden käyttö riippuu solusta ja tuoton mittakaavasta. Mekaanisia menetelmiä ovat ulträänikäsittely (sonikointi), korkeapainehomogenisointi (esimerkiksi French Press) ja jauhaminen. Ei-mekaanisia menetelmiä ovat lämpöshokki (jäädytys-sulatus), osmoottisen paineen ja kuivauksen käyttö. Erilaisia kemikaaleja ja entsyymejä, kuten lysotsyymejä ja DNAasia voidaan käyttää solujen hajotuksessa. [32, s. 183–184.]

Proteiinien puhdistuksessa voidaan käyttää saostusta (esimerkiksi ammoniumsulfaattila), kalvosuodatusta, uuttamista ja kiteytystä. Puhdistukseen soveltuvat myös sentrifugointi, esimerkiksi gradienttiultrasentrifugointi, jossa erikokoiset partikkelit kulkeutuvat tiheydensä mukaisesti eri faaseihin. Erilaiset kromatografiset puhdistusmenetelmät ovat yleisiä, ja niitä käytetään yksin tai usean menetelmän yhdistelmänä. [32, s.185–191.]

Proteiinien puhdistuksessa usein käytetty affiniteettikromatografia on tehokas erottelu- ja puhdistusmenetelmä, joka perustuu biologisten molekyylien kykyyn tunnistaa ja si-

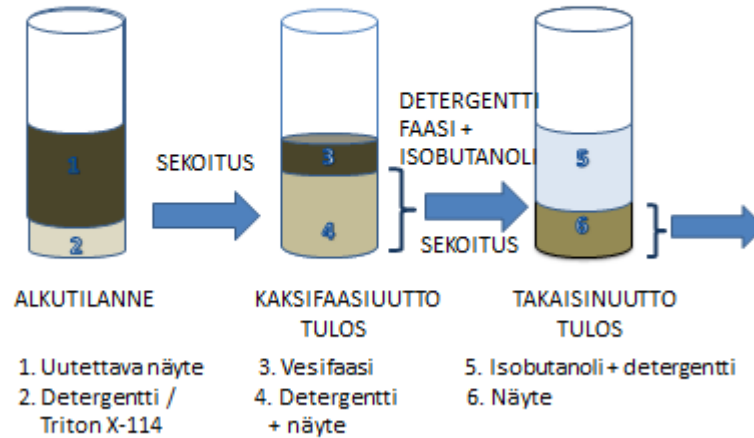
toutua vuorovaikutusten perusteella. Fuusioproteiinikonstruktioon liitetty Strep-tag, kahdeksan emäksen (Trp-Ser-His-Gln-Phe-Glu-Lys) pituinen peptidisekvenssi mahdollistaa proteiinin puhdistuksen affiniteettikromatografialla. Puhdistusmenetelmä hyödyntää proteiinin biologisia ominaisuuksia ja perustuu puhdistettavan proteiinin ja kromatografiamatriisiin sidotun spesifisen ligandin palautuvaan vuorovaikutukseen. Strep-tag-fuusioproteiini voidaan eluoida matriisista irti kilpailevaa uuttamista hyväksi käyttäen, biotiinilla tai biotiinin kaltaisella yhdisteellä. [66.]

Lisäksi puhdistukseen voidaan käyttää adsorptiofaasikromatografiaa ja käänteisfaasikromatografiaa, joissa puhdistus perustuu kiinteän stationäärifaasin ja liikkuvan faasin vuorovaikutusvoimiin. Yleisesti käytetyssä ioninvaihtokromatografiassa proteiinit erotuvat kokonaisvarauksensa perusteella, joko negatiivisesti varautuneita tai positiivisesti varautuneita ryhmiä sisältävissä kolonneissa. Hydrofobisten vuorovaikutusten kromatografia perustuu proteiinin hydrofobisiin aminohappoihin ja niiden sitoutumiseen korkeissa suolapitoisuuksissa hydrofobisiin ketjuihin. Viimeisenä niin sanottuna kiillotustoimenpiteenä käytetty geelisuodatus on molekyylin kokoon perustuva puhdistusmenetelmä. [32, s. 192–196; 67, s. 140–142.]

Kaksifaasiuutto

Tuotetun fuusioproteiinin puhdistuksessa voidaan käyttää myös kaksifaasiuuttoeristysmenetelmää, (engl. aqueous two-phase separation, ATPS) (kuva 9) yleisen affiniteettkromatografiapuhdistuksen sijaan. Kloonausvaiheessa fuusioproteiiniin liitetyn hydrofobiin hydrofobinen osa mahdollistaa ATPS-puhdistuksen.

KAKSIFAASIUUTTO (ATPS)



Kuva 9. Kaksifaasiuutto Triton X-114 -detergenttiä käyttäen. Kuvassa on esitetty nuolien päällä eri työvaiheet ja numeroilla eri näytekerrokset. Alkutilanteessa HFBI-tagilla varustetun fuusio-proteiinin joukkoon lisätään detergentti ja sekoitetaan yhdistelmää. Hydrofobiini hakeutuu detergenttifaasiin, johon lisätään alkoholia. Sekoituksen jälkeen saadaan näyte puhdistettuna.

Hydrofobiinit ovat homeen pinta-aktiivisia proteiineja, mitkä kykenevät muuttamaan fuusion hydrofobisuutta, ja näin siirtävät fuusioproteiinin detergenttifaasiin [17; 68]. ATPS:ssä puhdistettavaan tuottokasvatukseen lisätään ionisoimatonta detergenttiä, joka muodostaa veteen liukenemattoman faasin. Hydrofobiini hakeutuu detergenttifaasiin, minkä misellirakenteisiin hydrofobiinifuusioproteiini siirtyy. Luultavasti sen hydrofobisuus ja -fiilisyydet ovat sopivassa suhteessa, jotta vuorovaikutus misellien kanssa tapahtuu. Uuttamisessa käytetään detergentistä riippuvaa hieman samentumislämpötilaa korkeampaa lämpötilaa, jolloin saadaan aikaiseksi faasien erottuminen. Fuusioproteiini saadaan erotettua detergentistä takaisin uuttamalla alkoholilla. Alkoholilla voidaan rikkoa miseelirakennetta, jolloin hydrofobiini siirtyy takaisin vesifaasiin. ATPS -menetelmä on nopea sekä helppo suorittaa, ja se on muutettavissa suuren mittakaavan puhdistukseksi. [69.]

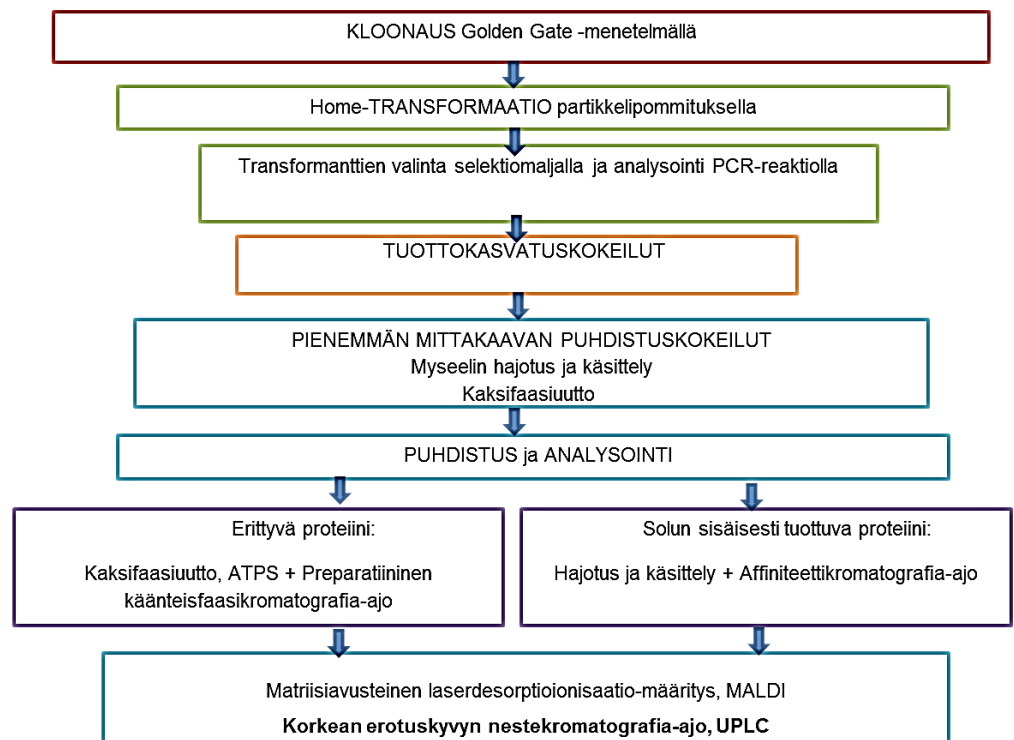
4 Materiaalit ja menetelmät

Työn tarkoituksena oli valmistaa konstruktio (kuva 10), joissa elastiset domeenit, poly-GB1 ja resiliini ovat kaksois-CBD:n ja HFBI:n osien välissä. Elastiset domeenit liitettiin DCBD-HFBI-geenin [2] domeeneja yhdistävän osan tilalle.



Kuva 10. pDCBD-GB1-HFBI ja pDCBD-resiliini-HFBI-konstruktio linearisena. Molempien konstruktioiden alussa on yksi CBDI- ja yksi CBDII -domeeni sekä lopussa HFBI-proteiini. Kuvassa yllä oleva polyGB1-konstruktio sisältää myös 10 GB1-domeenia ja kolme resiliini-yksikköä, ja sen pituus on 852 aminohappoa. Kuvassa alla oleva resiliinikonstruktio sisältää myös 17 resiliini-toistoyksikköä, ja sen pituus on 539 aminohappoa.

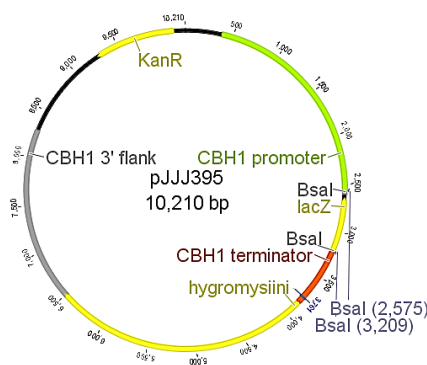
Työssä hyödynnettiin aiemmin julkaistuja elastisia domeeneja polyGB1 [39] ja resiliini [31]. Työ suoritettiin kuvassa 11 esitetyn virtauskaavion mukaisesti.



Kuva 11. Työn suorituksen kaavamainen esitys virtauskaavion muodossa.

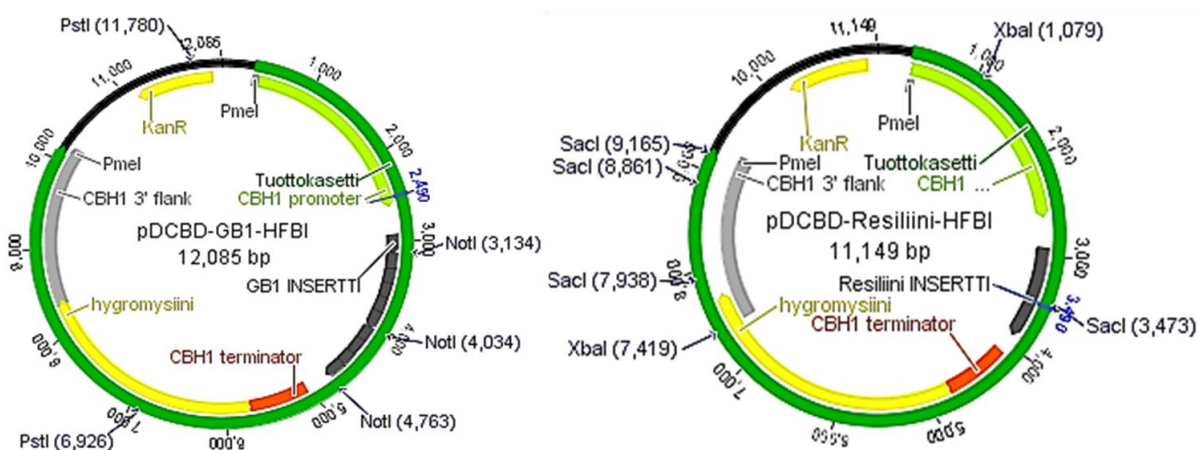
4.1 Elastisten proteiinikonstruktioiden kloonauk

Työssä kloonattiin DNA-konstruktio pDCBD-GB1-HFBI ja pDCBD-resiliini-HFBI Golden Gate -menetelmällä [40] pJJJ395 vektoriin (kuva 12). Inserttinä käytettiin plasmideina toimitettuja synteettisiä geenejä HFBI-strtag, DCBD-GB1 ja DCBD-resiliini (Genscript), joiden päihin oli liitetty *BsaI*-restriktioentsyymikohdat kloonauksia varten.



Kuva 12. Plasmidi pJJJ395 sisältää *cbh1*-promootorin ja -terminaattorin ja *cbh1*-geenin 3' flank-alueen. Plasmidissa on hygromysiini- ja kanamysiini-selektiogeenit sekä *LacZ*-geeni transformanttien seulontaa varten. Työssä kloonatut geenit sijoitettiin *BsaI*-restriktioentsyymin tunnistuskohtien väliin.

Fuusioproteiinien DCBD-GB1-HFBI ja DCBD-resiliini-HFBI tuottamiseksi homeessa (kuva 13), näitä proteiineja koodaavat geenit sijoitettiin plasmidiin pJJJ395.



Kuva 13. Tuottokasetin sisältävät plasmidivektorit pDCBD-GB1-HFBI ja pDCBD-resiliini-HFBI. Tuottokasetti on merkitty vihreällä plasmideihin. Plasmidit sisältävät kana- ja hygromysiini-selektiogeenit sekä *cbh1*-promootorin ja -terminaattorin ja *cbh1*-3' flank-alueen. *PmeI*-restriktioentsyymin kohdat osoittavat tuottokasetin katkaisukohdat ja tarkistusdigestioissa käytetty pDCBD-GB1-HFBI:lla *NotI*- ja *PstI*- sekä pDCBD-resiliini-HFBI:lla *SacI*- ja *XbaI*-kohdat.

Proteiinien tarkat koot määritettiin niiden sekvenssien perusteella. Erittyvien DCBD-GB1-HFBI- ja DCBD-resiliini-HFBI-proteiinikonstruktioiden laskennalliset koot olivat järjestyksessä 87 058,9 Da ja 47 689,2 Da, solunsisäisesti tuottuvien DCBD-GB1-HFBI-ER- ja DCBD-resiliini-HFBI-ER-proteiinikonstruktioiden laskennalliset koot olivat järjestyksessä 88 663,5 Da ja 49 293,8 Da. [70.]

Kloonausta varten valmistettiin taulukon 2 mukaiset reaktiot. Näytteitä inkuboitui 3 h 37 °C:ssa, jonka aikana vektori ja plasmidit digestoitiin ja ligoitiin. Reaktioita jatkettiin 10 min 50 °C:ssa, jolloin poistettiin plasmidit, jotka vielä sisälsivät *Bsa*I- restriktiokohdan. Lopuksi inkuboitui 5 min 80 °C:ssa, jossa inaktivoitiin käytetyt entsyymit.

Taulukko 2. Golden Gate -reaktioon pipetoidut reagenssit sekä niiden määrät.

	Pitoisuus	pDCBD-GB1-HFBI	pDCBD-resiliini-HFBI	Negatiivinen kontrolli
pJJJ395 kohde-vektori	100 ng/μl	2 μl	2 μl	2 μl
HFB1-strtag-plasmidi	100 ng/μl	1 μl	1 μl	1 μl
DCBD-GB1-plasmidi	200 ng/μl	2 μl	-	-
DCBD-resiliini-plasmidi	200 ng/μl	-	1,9 μl	-
<i>Bsa</i> I-restriktioentsyymi (Biolabs)	10 U/μl	1 μl	1 μl	1 μl
Ligaasi-puskuri (Promega)	10 x	2 μl	2 μl	2 μl
T4 DNA -ligaasi (NEB)	400U/μl	3 μl	3 μl	3 μl
Steriili vesi		9 μl	9,1 μl	11 μl
Yhteensä		20 μl	20 μl	20 μl

Reaktiossa muodostuneet konstruktioplasmit transformoitiin kompetentteihin *E. coli* XL1Blue -bakteerisoluihin lämpöshokkimenetelmällä ja maljattiin LB-maljoille, jotka sisälsivät 50 μg/ml kanamysiiniä, 80 μg/ml X-gal:a ja 100 μM IPTG:tä. Oikeiden pesäkkeiden seulontaan käytettiin β-galaktoosin α-komplementaatiota. Transformaation kontrollina käytettiin pelkkää pJJJ395-vektoria.

Transformaatiomaljoilta valittiin kuusi erillistä valkoista pesäkettä kasvamaan 3 ml:n putkikasvatuksena LB-kasvatusalustaan (50 μg/ml kanamysiini) 37 °C:ssa ravistelussa (200 rpm) yön yli. Soluista eristettiin plasmidi-DNA Nucleospin-eristyskittiä (Macherey-Nagel) käyttäen.

Restiktioentsyymien katkaisun avulla tarkistettiin, sisältävätkö konstruktioplasmidit oikean kokoisen insertin. Digestiossa käytettiin *NotI*- sekä *PstI*- (pDCBD-GB1-HFBI -konstruktioille) ja *SacI*- sekä *XbaI*- (pDCBD-resiliini-HFBI-konstruktioille) restiktioentsyymejä (New England Biolabs, NEB). Tuotteet ajettiin 1-%:sella agarosigeelielektroforeesi-ajolla (AGE) 1 h, 80 V:n jännitteellä, 40 mM Tris-HCl, 200 mM Na-asetaatti, 20 mM EDTA pH 8 -puskuria (TAE) käyttäen ja geelit värjättiin SYBR Safe:llä (Invitrogen). Geelillä ajettiin 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas), jonka koot ovat 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200 emäsparia (engl. bp)

Molemmista konstruktioista sekvensoitiin kaksi transformanttia (MacroGen, Netherlands). Konstruktioille pDCBD-GB1-HFBI käytettiin alukkeita O-cbh1-prom, O-EI-01, O-EI-02, TO43 ja O-EI-03 ja konstruktioille pDCBD-resiliini-HFBI alukkeita O-cbh1-prom, O-EI-04, TO43 ja O-EI-03 (taulukko 3).

Taulukko 3. Konstruktioplasmidien sekvensoinnissa ja PCR-reaktiossa käytettyjen alukkeiden sekvenssit.

Aluke	Sekvenssi	Sekvensointisuunta
TO10	5'-CACAGAATCTTTTGAGGCA-3'	Koodaava juoste
TO40	5'-GCTCGTTGCCAGAGTAACTAC-3'	Ei-koodaava juoste
TO43	5'-TCATGATACGGGCTCACCAAG-3'	Ei-koodaava juoste
O-cbh1 prom.	5'-ATCCTCCAGGAGACTTGTACACC-3'	Koodaava juoste
O-EI-03	5'-GACCAACTTYTCCGTTGCGAGGC-3'	Ei-koodaava juoste
O-EI-04	5'-CGCCCTTCGGACACGTATGGTGC-3'	Koodaava juoste
O-EI-05	5'-GCCGCCGGGCCCATGCCCGTG-3'	Ei-koodaava juoste
O-EI-06	5'-AGCAACGGCAACGGCAATGTTTG-3'	Koodaava juoste

Hometransformaatioissa siirrettävät tuottokasetit irrotettiin vektorista *PmeI*-restiktioentsyymiä (NEB) käyttäen. Pilkotut DNA-näytteet ajettiin 1-%:sella AGE:lla, TAE-puskurissa, käyttäen värjäyksessä etidiumbromidia. Geelillä ajautuneista vyöhykkeistä leikattiin pDCBD-GB1-HFBI-konstruktioilla 9742 emäsparin ja pDCBD-resiliini-HFBI-konstruktioilla 8806 emäsparin kokoiset palat ja DNA:t eristettiin Extract II -kitillä (Nucleospin). DNA liuotettiin 10 mM Tris-HCl pH 8 -puskuriin ja konsentraatio määritettiin spektrofotometrillä (Nanodrop, Thermo Scientific).

4.2 Hometransformaatio

Konstruktioit transformoitiin *T. reesei* -homeeseen, kantaan M658, partikkelipommituksella. Geenit integroitiin homologisen rekombinaation avulla homeen genomien *cbh1*-lokukseen eli *cbh1*-promoottorin ja -terminaattorin väliin. Hometransformaatioissa käytettiin 5 µg *PmeI*- digestoituja tuottokasetteja ja negatiivisena kontrollina käytettiin steriiliä vettä.

Partikkelipommituksessa transformoitava DNA sidottiin positiivisesti varautuneiden, mikrokantajina toimivien kultapartikkelien pintaan, jotka ammuttiin paineilmalla tyhjiössä oleviin homeitiöihin. Transformaatioissa käytetyille perunan dekstroosiravintoagar -maljoille, (engl. potato dextrose agar, PDA) levitettiin niiden keskelle $1,8 \times 10^7$ itiötä ja annettiin kuivua 15 min ajan. Itiöiden määrät laskettiin Cellometer Auto 10 (Nexcelom Bioscience) -laskuria käyttäen. Kutakin DNA-konstruktioa kohden transformoitiin 5 maljaa. Kultapartikkelit (Bio-Rad) (0,6 µm, 50 µl / transformaatio) pestiin 3 kertaa 96-%:sella etanolilla ja steriilillä vedellä, välissä sentrifugoiden (20 000 g, 20 s). Transformoitava DNA, 50 µl 2,5 M CaCl_2 :a-liuosta ja 20 µl 100 mM spermiidiini-liuosta (Sigma) lisättiin kultapartikkeleihin koko ajan sekoittaen. Muodostuneet spermiidiini-DNA-kultapartikkeli -kompleksit pestiin vielä 96-%:sella etanolilla ja lopuksi kompleksit suspensioitiin 50 µl:lla 96-%:sta etanolia.

Partikkelipommituksessa käytettiin 8 µl DNA:lla peitettyä mikrokantajaa transformaatioita kohden. Pommitus suoritettiin PDS-100/He Particle Delivery System -laitteistolla (Bio-Rad), ohjetta soveltaen (Hakanen, Mira julkaisemattomat tulokset). Pommituksen jälkeen transformoituneet itiöt levitettiin levityskolmiolla maljalle lisäämällä 100 µl steriiliä 0,9-%:sta NaCl -liuosta. Maljojen päälle pipetoitiin 10 ml TOP-agaria (3 % agar, 110 mM KH_2PO_4 , 111 mM gukoosi, 0,1 % hivenaineet, 1 M sorbitol, 2,4 mM MgSO_4 , 4,1 mM CaCl_2) sisältäen 150 mg/ml hygromysiini B:tä (CalBioChem) selektoivana aineena. Annettiin jähmettyä 1 h ajan ja inkuboitiin +28 °C:ssa yhteensä 7–13 vrk ajan.

4.3 Transformanttien valinta

Transformaatioissa muodostuneista pesäkkeistä siirrostettiin silmukalla myseeliä 5 viivaa jokaiselle triton-hygromysiini -selektiomaljalle (110 mM KH_2PO_4 , 111 mM glukoosi, 0,1 % hivenaineet, 1,6 % agar, 0,1 % triton X-100 ja 125 µg/ml hygromysiini). Maljoja kasvatettiin 7 vrk +28 °C:ssa. Viivoista otettiin silmukalla polymeraasiketjureaktionäyt-

teet (PCR-näytteet) sekä siirrostettiin PDA-maljoille puhdasviljelmät. Puhdasviljelmistä, niiden kasvettua 7 vrk +28 °C:ssa, kerättiin itiöt talteen 3 ml:aan 0,8-%:seen NaCl, 0,025-%:seen Tween 20, 20-%:seen glyseroli -liuokseen levityskolmiota käyttäen. Itiöt suodatettiin erilleen myseelistä pumpulin läpi. Itiöistä tehtiin 0,9-%:seen NaCl-liuokseen 10^{-6} - ja 10^{-7} -laimennokset, joista levitettiin 100 µl triton-hygromysiini -selektiomaljoille. Maljoja kasvatettiin 7 vrk +28 °C:ssa. Selektiomaljoilta valittiin yksi pesäke ja vedettiin silmukalla puhdasviljelmät PDA -maljalle, sekä otettiin näyte PCR-reaktioon. Täyteen kasvaneilta PDA-maljoilta kerättiin itiöt -80 °C:n säilytykseen.

Transformantit tarkastettiin PCR:llä käyttäen Phire PCR-testiä (Thermo scientific) ohjeen mukaisesti. Triton-hygromysiini- ja PDA-maljalta otettiin myseeliä pipetinkärjellä 20 µl näytelaimennos-puskuriin, jossa se rikottiin pipetin kärjellä ja laitettiin sekoitukseen 5 min ajaksi, jolloin DNA vapautui myseelistä. Sentrifugoinnin (20 000 g, 5 min, RT) jälkeen DNA otettiin talteen supernatantista myseelin jäädessä pellettiin. PCR-reaktioon pipetoitiin DNA ja muut yhdisteet taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. PCR-reaktion pipetointimäärät transformanttien tarkistukseen.

Reagenssi	Määrä
Templaatti-DNA	0,5 µl
2 x Phire PCR -puskuri	10 µl
Alukkeet, 100 µM	0,1 + 0,1 µl
Phire Hot Start II DNA polymeraasi	0,4 µl
steriili vesi	8,9 µl

PCR-reaktiossa tarkastettiin transformoidun insertin alku- ja loppuosan olemassaolo sekä tuottokasetin integroituminen oikeaan paikkaan eli homeen *cbh1*-geenin deletio. Käytetyt alukeparit (sekvenssit taulukko 3, sivu 21) ja ohjelmien olosuhteet ovat taulukossa 5. Ohjelman syklimäärä on 30. Alukkeiden ja templaatti DNA:n paritumislämpötila riippui käytetyistä alukkeista.

Taulukko 5. PCR-reaktion olosuhteet transformoidun insertin alkuosan (I), loppuosan (II) sekä *cbh1*-deletion (III) tarkistuksessa.

	I	II	III
Alukkeet	O- <i>cbh1</i> -prom ja O-EI-05	O-EI-06 ja TO 43	T10 ja T40
Denaturointi, 5 min ^a ja 5 s /sykli	98 °C	98 °C	98 °C
Pariutuminen, 5 s / sykli	67 °C	70 °C	62 °C
Synteesi, 20 s / sykli ja 1 min ^b	72 °C	72 °C	72 °C

^aEnsimmäinen denaturointi 5 min

^bViimeinen synteesi 10 min

PCR-reaktiot analysoitiin 1,2-%:sella AGE:lla 1 h 80 V:n jännitteellä, TAE -puskurissa. Ajossa käytettiin kokomarkkerina 1 kb DNA-standardi (Fermentas), jonka koot ovat 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 ja 250 emäsparia.

4.4 Yhdistelmäproteiinien tuotto homeessa

Yhdistelmäproteiineja tuotettiin sekä solusta erittyvinä että solun sisäisesti tuotettuina. Proteiinit DCBD-GB1-HFBI ja DCBD-resiliini-HFBI tuotettiin solusta kasvatusalustaan erittyvinä. Solunsisäisesti tuotetut yhdistelmäproteiinit olivat samanlaisia edellä mainittuihin verrattuna, lukuun ottamatta proteiinikonstruktion loppuun lisättyä HDEL-aminohapposekvenssiä sekä resiliinin ja HFBI-sekvenssien välistä ENLYFQG-aminohapposekvenssiä. Sekvenssi HDEL on luonnollinen endoplasmakalvostoon (endoplasminen retikulumi) jäävän proteiinin signaali ja ENLYFQG sisältää proteaasikatkaisukohdan TEV-proteaasille (Tobacco Etch Virus). Näitä proteiineja vastaavat DNA-konstruktioit olivat M122 -homekannassa. Konstruktioille käytettiin nimiä DCBD-GB1-HFBI-ER ja DCBD-resiliini-HFBI-ER ja vastaavat homekannat antoi ystävällisesti tutkimuksen käyttöön Géza Szilvay (VTT).

Yhdistelmäproteiinien tuotossa käytetyt kasvatusalustat olivat hometuotossa yleisesti käytettyjä TrMM-kasvatusalustoja eri ravintoaineilla lisättynä ja eri pH:ta käyttäen (taulukko 6). TrMM-kasvatusalusta sisälsi 110 mM KH₂PO₄:a, 38 mM Na₂SO₄:a, 0,1 % hiivenaineita, 2,4 mM MgSO₄:a ja 4,1 mM CaCl₂:a. Kasvatusalustoihin lisätyt proteaasi-

inhibiittorit olivat 4 µg/l soijan trypsiini-inhibiittori, (engl. soybeans trypsin inhibiittori, SBTI) (Sigma) ja 10 µM pepstatiini 100-%:sessa dimetyylisulfonissa (Sigma).

Taulukko 6. Kasvatusalustat yhdistelmäproteiinien tuotossa.

	Kasvatusalusta ^a	pH	Erittyvä proteiini	Sisäisesti tuotettu proteiini
A	TrMM, 4 % laktoosi, 2 % rankki, 100 mM PIPPS, 38 mM (NH ₄) ₂ C ₆ H ₅ O ₇	4,5	X	X
		ja		
		5,5	X	
B	TrMM, (38 mM (NH ₄) ₂ SO ₄) ^b , 4 % laktoosi, 2 % rankki, 100 mM PIPPS	5,2		X
C	TrMM, 1 % hiivaekstrakti, 2 % cellobioosi, 1 % sorboosi, 100 mM PIPPS, 38 mM (NH ₄) ₂ C ₆ H ₅ O ₇	4,5	X	

^a Kaikkia kasvatusalustoja käytettiin inhibiittorien (SBTI ja pepstatiini) kanssa sekä ilman.

^b Käytettiin Na₂SO₄:n sijasta typenlähteenä.

Tuottokasvatuksiin pipetoitiin itiöitä 2×10^6 ml kasvatusalustaa kohden. Kasvatukset suoritettiin +28 °C:ssa, 200 rpm ravistelussa. Erittyvän tuoton kasvatuksessa kontrollina käytettiin kantaa M658 ja solun sisäisen tuoton kasvatuksissa kantaa M122.

4.4.1 Erittyvien yhdistelmäproteiinien tuotto

Yhdistelmäproteiinin erittyvän tuoton 4 ml:n kasvatukset tehtiin 24-kuoppalevyllä kasvatusravistelijassa (Berner infors), 800 rpm ravistelussa ja 86 % ilmarkosteudessa. Kuoppalevyn päälle asetettiin hengittävä kalvo (VWR). Pienen mittakaavan tuottokokeiluissa käytettiin kasvatusalustaa A pH:ssa 4,5 ja 5,5 ja kasvatusalustaa C pH:ssa 4,5 (taulukko 5). Kasvatuksista otettiin tuottopäivinä 4, 5 ja 7 supernatanttinäytteet (200 µl).

Kasvatukset 350 ml:ssa tehtiin DCBD-GB1-HFBI-konstruktioille käyttäen kasvatusalustaa A, jonka pH oli 5,5 sekä DCBD-resiliini-HFBI-konstruktioille kasvatusalustaa A, jon-

ka pH oli 4,5. Kasvatuksista ei otettu välinäytteitä ja ne lopetettiin viidennen kasvupäivän jälkeen.

Molemmille erittyville konstruktiolle tehtiin 7 l:n kasvatus fermenttorissa. Esikasvatuksessa käytettiin 5×10^8 itiötä 0,5 ml:ssa ja kasvatusalustaa, joka sisälsi 3 % laktoosia, 12 % rankkiekstraktia, 110 mM KH_2PO_4 :a, 38 mM Na_2SO_4 :a, 0,2 % hivenaineita, 2,4 mM MgSO_4 :a ja 5,5 mM CaCl_2 :a. Kasvatusliuoksen pH säädettiin NaOH:lla 5,5:ksi. Kolmen päivän jälkeen alitettiin fermentointi käyttäen alustaa, joka sisälsi 6 % laktoosia, 25 % rankkiekstraktia, 37 mM KH_2PO_4 , 38 mM Na_2SO_4 , 0,2 % hivenaineita, 2,4 mM MgSO_4 ja 5,5 mM CaCl_2 . DCBD-GB1-HFBI-konstruktion kasvatusalustan pH säädettiin NaOH:lla 5,5:ksi ja DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion kasvatusalustan pH säädettiin NaOH:lla ja H_3PO_4 :llä 4,5:ksi. Kasvatukseen lisättiin SBTI(4 µg/ml) sekä pepstaatiini (10 µM) proteaasi-inhibiittoreita kolmannen kasvatuspäivän jälkeen päivittäin. DCBD-GB1-HFBI-konstruktia kasvatettiin 7 vrk ja DCBD-resiliini-HFBI-konstruktia 4 vrk. Fermenttorikasvatuksista otettiin päivittäin 5 ml:n näytteet analysointia varten. Fermentointi suoritettiin tutkimuspalveluna VTT:llä.

4.4.2 Yhdistelmäproteiinien tuotto solun sisälle

Yhdistelmäproteiinin sisäisen tuoton kasvatukset tehtiin 350 ml:n erissä. Kasvatukseen otettiin konstruktioiden DCBD-GB1-HFBI ja DCBD-resiliini-HFBI transformantteja. Kasvatuskokeilussa käytettiin A-kasvatusalustaa pH 4,5:lla ja B-kasvatusalustaa pH 5,2:lla. Ensimmäisestä kasvatuksesta otettiin 2 ja 5 ml:n myseelinäytteet 3., 4., 5. ja 7. tuotto-päivänä. Muissa kasvatuksissa otettiin kasvaneet myseelit talteen kasvatuksen lopetuksen yhteydessä. Myseelit suodatettiin ja pestiin steriilillä vedellä GF/B lasifiltterin (Whatman) läpi, josta ne kerättiin säilytykseen -80°C :seen.

4.5 Yhdistelmäproteiinien eristys ja puhdistus

4.5.1 Liukoisuuskokeilut ja käsittelyt

Sisäisesti tuotetun proteiinin myseelit kuivattiin yön yli kylmäkuivurissa (Hetosic). Myseeli rikottiin hienojakoiseksi joko putkessa spaattelilla tai huhmareessa survimella. Murskattua myseeliä punnittiin 50 tai 100 mg 2 ml:n mikrosentrifuugiputkiin. Putkiin lisättiin 200 µl lasihelmiä (Sigma), joiden halkaisija oli 0,5 mm, ja putket asetettiin -20°C :seen kylmäblokkiin. Myseelit hajotettiin kaksi kertaa mekaanisesti lasihelmien avulla

Retsch MM301 -solunhajoituslaitteella, 30 s ja 29 Hz:n ravistelutaajuudella. Ensimmäinen hajotuskerta suoritettiin ilman puskuria ja toinen 1,5 ml:n, kylmän puskurin lisäyksen jälkeen. Solut ja lasihelmet erotettiin liukoisesta näytteestä sentrifugoimalla (10 000 g, 5 min, +4 °C:ssa). Puskurit, joihin myseelit liukoisuuskokeen hajotuksessa liuotettiin, olivat 50 mM Na-asettaatti, pH 5,5, 50 mM K-fosfaatti pH 6,5, 50 mM fosfaattipuskuroitu natriumkloridiliuos pH 7,3 ja 50 mM Tris-HCl pH 8,0.

Liuotuksen jälkeen hajotettu myseeli käsiteltiin 6 M urea:lla, 20-%:sella SDS:llä tai kuumennettiin +65 °C:n, +75 °C:n ja +95 °C:n lämpötilassa. Käsittelyaika oli 40 min, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin (10 000 g, 5 min, huoneen lämpötilassa). Muodostunut pelletti pestiin resuspensoimalla puskuriin kaksi kertaa, pesujen välissä sentrifugoiden (10 000 g, 5 min, huoneen lämpötilassa).

4.5.2 Kaksifaasiuutto eri detergenttejä käyttäen

Kaksifaasiuutossa (engl. aqueous two-phase separation, ATPS) näytemäärä oli 1 ml ja koe suoritettiin 5 ml:n lasiputkissa. Ionisoitumattomat detergentit, joita käytettiin kaksifaasiuutossa, olivat Triton X-114 (Fluka), Agrimul NRE 1205 (Cognis Chemicals), Berol 532 (Akzo-Nobel), LF28 (Croda Chocques) ja Lutensol XL50 (BASF SE). Näytteen ja detergentin yhdistelmää sekoitettiin voimakkaasti ja tämän jälkeen käännettiin 10 min ajan pyörösekoittimella. Vesi- ja detergenttifaasien annettiin erottua 1 h ajan, erottumiselle sopivassa lämpötilassa (taulukko 7). Käyttölämpötila valittiin korkeammaksi kuin detergenttien erottumislämpötilat (määritetty aiemmin, Katri Kurppa, VTT, julkaisemat tulokset). Menetelmässä näyteproteiini siirtyy detergenttifaasiin, joka tiheydensä mukaan sijaitsee, joko veden yläpuolella tai alapuolella (taulukko 7). Valtaosa muista proteiineista jää vesifaasiin. Ennen takaisinuuttoa detergenttifaaseihin, paitsi ei Triton X-114:een ja Lutensol XL50:een lisättiin ulkoisen tuoton proteiinia uutettaessa 50 mM NaAc pH 5 -puskuria ja sisäisen tuoton proteiinia uutettaessa 50 mM Tris-HCl pH 8 -puskuria. Takaisinuutto suoritettiin lisäämällä detergenttifaasiin Triton X-114:aa käytettäessä 10-kertainen, ja muilla 5-kertainen määrä isobutanolia. Suuremmalla näytemäärällä uutto suoritettiin erotussuppilossa. Näyte ja detergentti sekoitettiin lasipullossa ja siirrettiin erotussuppiloon, jossa faasit erottuivat. Sisäisen tuoton myseelit hajotettiin ja osa myseeleistä käsiteltiin ennen uuttoa.

Taulukko 7. Kaksifaasiuutossa käytetyt detergentit, niiden pitoisuudet, lämpötilat ja sijainti vesifaasin suhteen.

Detergentit	Käytetty pitoisuus	Käyttö lämpötila	Detergenttifaasin sijainti uutossa
Triton X-114	4 %	+24 °C	Alafaasi
Agrimul NRE1205	2 %	+22 °C	Yläfaasi
Berol 532	2 %	+22 °C	Yläfaasi
LF28	4 %	+22 °C	Yläfaasi
Lutensol XL50	2 %	+37 °C	Alafaasi

4.5.3 Affiniteetikromatografiapuhdistus

Erittyvän tuoton kasvatuksessa saatu proteiini puhdistettiin StrepTrap HP 5 ml -pylväällä (GE Healthcare). Solun sisäisen tuoton kasvatuksessa saatu myseeli hajotettiin ja liuotettiin 50 mM Tris-HCl pH 8 -puskuriin ja puhdistettiin 1 ml:n Strep-Tactin-pylväällä (IBA). Ajonopeus oli puhdistuksessa 2 ml/min tai 1 ml/min ja pylväät tasapainotettiin 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8 -ajopuskurilla. Näyte eluotettiin pylvästä 2,5 mM D-desthiobiotiinilla (IBA), joka oli liuotettuna ajopuskuriin, samalla keräten 1,5 ml:n eluointifraktioita. Ajo suoritettiin BioFlow-kromatografia-laitteistolla (Bio-Rad).

4.5.4 Preparatiivinen käänteisfaasinestekromatografia-ajo

Käänteisfaasinestekromatografia (RPC) -puhdistuksessa käytettiin Äkta Explorer (Amersham Pharmacia Biotech) nestekromatografia-laitteistoa ja C4 Semiprep, 10 x 250 mm -käänteisfaasipylvästä. Eluenteina käytettiin 0,1 % trifluoroetikkahappoa (TFA, Fluka BioChemika) vedessä ja 0,1-%:ssa TFA asetonitrilissä (ACN, Rathburn Chemicals Ltd, HPLC grade). Ajonopeutena oli 4 ml/min. Näyte eluotettiin kolmeosaisella 0–20 %, 20–65 % ja 65–100 % gradientilla. Eluoidut näytteet kerättiin 1,2 ml:n fraktioina ja kolonnista tulevien komponenttien detektio tapahtui UV/VIS-ilmaisimen avulla.

4.6 Yhdistelmäproteiinien analysointi

4.6.1 Proteiinien geelielektroforeesi

Proteiinin tuottoa ja puhtautta analysoitiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesia käyttäen (SDS-PAGE). Erittäytystä proteiininäytteistä yhdistettiin 15 µl ja 5 µl 4 x Laemmli-näytepuskuria (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 40 % glyseroli, 8 % SDS, 0,02 % bromifenoli sininen, 20 % β-merkaptotetanoli, 4 x LSB + β-merkaptotetanoli). Sisäisesti tuotettujen proteiinien 2 ml:n myseleihin pipetoitiin 1 ml 2 x LSB + β-merkaptotetanoli -puskuria. Näytteet sentrifugoitiin (20 000 g, 5 min, huoneenlämpötila) ja seoksesta käytettiin 20 µl liukoista näytettä. Ennen geelille pipetointia näytteet keitettiin +95 °C:ssa ja sentrifugoitiin. Analyysissä käytettiin 4–20 % SDS-PAGE Criterion TGX-gradienttigeelä (Bio-Rad) ja 250 mM HEPES pH 7,4, 0,4 M NaCl, 2 mM imidatsoli, 20 % glyseroli -ajopuskuria. Menetelmässä kokonsa perusteella eroavat proteiinit vertailtiin Precision Plus Protein Standardi (Bio-Rad) -standardien molekyylimassoihin. Kontrollina käytettiin 1 µg puhdistettua HFBI-proteiinia.

SDS-PAGE:ssa ajetut proteiinit värjättiin Coomassie Brilliant Blue G-250 -väriainetta käyttäen, Page Blue Stainin (Fermentas) -liuoksella. Geeleissä oleva SDS huuhdottiin pois 2 x 10 min vedellä ja väriliuoksen annettiin vaikuttaa 1 h RT-ravistelussa, jonka jälkeen väri huuhdeltiin vedellä pois.

4.6.2 Western blot -analysointi

SDS-PAGE:ssa ajetut proteiiniwyhykkeet siirrettiin elektroforeettisesti 0,2 mm:n nitroselluloosafiltterille (Bio-Rad), käyttäen Trans-Blot Turbo -laitetta (Bio-Rad). Siirtoaika oli 7 min 21 V jännitteellä. Proteiini kiinnitettiin filtteriin +37 °C:ssa, käyttäen 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,025 % Tween20 -puskuria (TBST), johon oli lisätty 3 % rasvatonta maitoa, 1 h ajan. Filtterit pestiin 3 x 15 min TBST -puskurilla. Primäärisenä vasta-aineena käytettiin HFBI:n tunnistavaa kanissa valmistettua polyklonaalista anti-HFBI-vasta-ainetta 1:3000 laimennoksella TBST-puskurissa. Sekundäärisenä vasta-aineena käytettiin vuohen anti-kani IgG (H+L) alkaalinen fosfataasi (AP)-konjukoitua vasta-ainetta (Bio-Rad) 1:2000 laimennoksena TBST-puskurissa. Värimuodostus havainnoitiin käyttäen 330 µg/ml nitrosinitetratsoliumikloridia 70-%:sessa dimetyyliformamidissa (Promega) ja 165 µg/ml 5-bromi-4-kloori-3-indoli-fosfaatti 100-%:sessa dimetyyliformamidissa (Promega) 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ -puskurissa (AP). Värimuodostus lopetettiin pesemällä filttiä vedellä. SDS-PAGE:lla

ajettuja näytteitä analysoitiin myös käyttämällä Strep-tactin-AP-vasta-ainetta (IBA) 1:3000 laimennoksena. Värimuodostus havainnoitiin, kuten yllä on mainittu. SDS-PAGE-geelit ja Western blot -analyysit skannattiin GS-710 Calibrated Imaging Densitometer -laitteella (Bio-Rad).

4.6.3 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-ajo

Proteiinien analysointiin käytettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC) Acquity I-class UPLC -laitteisto (Waters). Ajot suoritettiin käänteisfaasiajona käyttäen BEH 300 C4 -pylvästä (Waters), jonka koko oli 2,1 x 100 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Ajossa käytettiin eluenttina 0,1-%:ssa TFA:a vedessä ja 0,1-%:ssa TFA ACN:ssä. Näytettä injisoitiin 5 µl, ajo suoritettiin +40 °C:n lämpötilassa ja ajonopeutena oli 0,9 ml/min. Eluutiossa käytettiin gradienttiajota 10–65 % + 65–100 % orgaaninen, pooliton eluentti. Ajosta saaduista piikeistä määritettiin retentioaika. Piikin pinta-alasta laskettiin näytteen konsentraatio, käyttäen HFBI:lle määritettyä standardisuoraa. Standardisuoran tekemistä varten valmistettiin HFBI-proteiinista näytteet 0,01, 0,025, 0,04, 0,05 ja 0,1 mg/ml konsentraatiossa. Jokaisesta standardista tehtiin kolme rinnakkaista näytettä. Saatujen piikkien pinta-aloista, pienet sivupiikit mukaan lukien, laskettiin standardisuora pienemmän neliösumman menetelmällä.

4.6.4 Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio-määritys

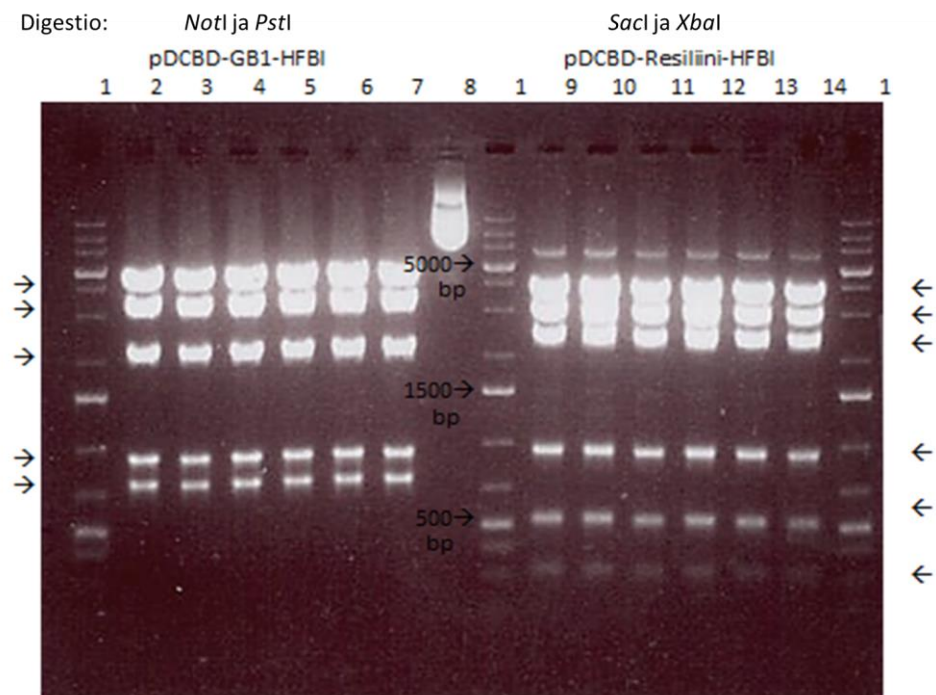
Matriisiavusteista laserdesorptioionisaatiota, (engl. matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) -tekniikkaa käytettiin proteiinien molekyylimassan selvittämiseen. UV-alueella absorboivaa sinappihappo (Fluka) matriisia otettiin spaattelinkärjellinen mikrosentrifugiputkeen ja lisättiin 50 µl 50-%:nen ACN 0,1-%:ssa TFA:ssa. Sekoitettiin 5 min ja sentrifugoitiin (10 000 g, 5 min). Matriisiliuosta pipetoitiin 2 µl ja näytettä 2 µl sekoittaen ne keskenään. Tästä seoksesta pipetoitiin 2 µl teräslevylle. Seoksen annettiin kuivua 15 min ennen analyysin alkua. Laite kalibroitiin käyttäen kaupallisia standardinäytteitä (Bruker). Näyte höyrystettiin laserpulssilla ja molekyylit saatiin ionisoitumaan varauksen siirryttyä analyytin ja matriisin välillä. Analysaattorina käytettiin lentoaikamassaspektrometriä, (engl. time of flight, TOF).

5 Tulokset

5.1 Kloonaus

Plasmidikonstruktioiden pDCBD-GB1-HFBI ja pDCBD-resiilini-HFBI Golden Gate -kloonauksen ja XL1Blue -soluihin transformaation tulokseksi saatiin vain valkoisia pesäkkeitä. Pesäkkeiden muuttuminen sinisistä valkoisiksi osoittaa kloonauksen onnistuneen ja geeni-inserttien korvanneen *lacZ'*-geenin. Reaktio ilman geeni-inserttiä tuotti vain yhden pesäkkeen (valkoinen) ja kohdeplasmidi pJJJ395:n transformaatio täyden maljan sinisiä pesäkkeitä.

Muodostuneiden plasmidien oikeudellisuus analysoitiin restriktioentsyymidigestiolla (kuva 14). Molemmista konstruktioista valitut kuusi transformanttia antoivat oikeat DNA-frakmenttien koot.



Kuva 14. Kloonattujen konstruktioiden tarkistus *NotI*- ja *PstI*- sekä *SacI*- ja *XbaI*-restriktioentsyymidigestioilla. Sekvenssien perusteella lasketut fragmenttien koot ovat pDCBD-pGB1-HFBI -plasmidikonstruktioilla 4858, 3447, 2208, 904 ja 733 bp sekä pDCBD-resiilini-HFBI -plasmidikonstruktioilla 3999, 3071, 2394, 927, 519 ja 308 bp, ja merkittynä kuvassa nuolilla. pDCBD-GB1-HFBI:n transformantit 1–6 ovat kohdissa 2–7 ja pDCBD-resiliini-HFBI:n transformantit 1–6 kohdassa 9–14. Linearisoitu pJJJ395 vektori on 8 rivillä. Kokostandardi 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas) on riveillä 1.

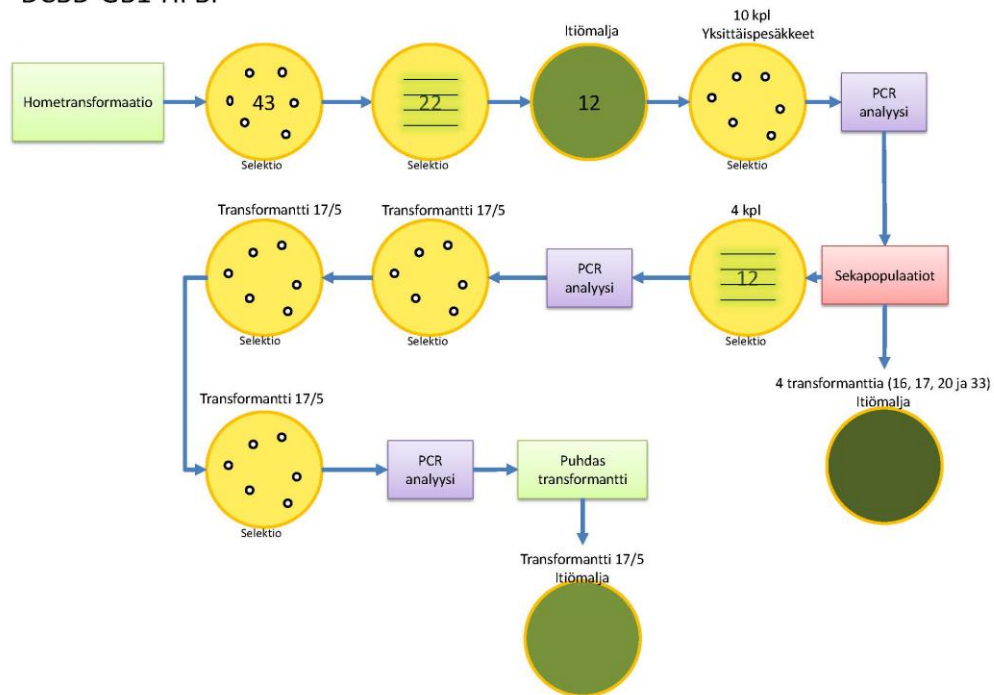
Molemmista konstruktioista tarkistettiin kaksi transformanttia sekvensoimalla, ja kaikki neljä osoittautuivat sekvenssiltään oikeaksi

5.2 Hometransformaatio

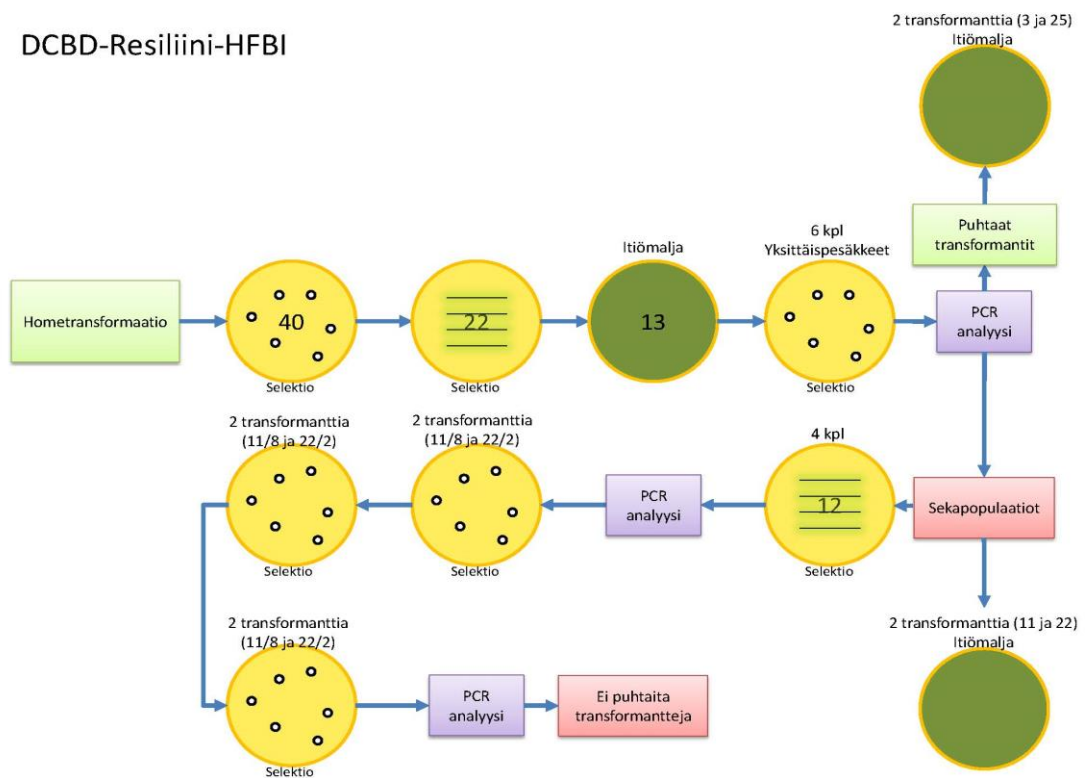
Hometransformaatiossa kloonatuista plasmidikonstruktioista digestoitui tuottokasetti *PmeI*- restriktioentsyymillä ja siirrettiin katkaistu alue homologista rekombinaatiota ja partikkelipommitusta käyttäen *T. reesei* -homekantaan. Kuvan 15 mukaisesti home-transformaation selektiomaljoilla kasvoi 13 vrk:n kasvatuksen jälkeen konstruktio DCBD-GB1-HFBI:lla 43 transformanttipesäkettä ja konstruktio DCBD-resiliini-HFBI:lla 40 transformanttipesäkettä. Seuraavaksi suoritettiin sarja maljauksia, joissa pyrittiin erottamaan homeet yksittäisiksi klooneiksi ja identifioimaan pysyvästi transformoituneet kannat. Kun pesäkkeistä siirrostettiin viivat Triton-hygromysiini-selektiomaljoille, kasvoi molempien konstruktioiden transformanteista 22. Näistä viivoista siirrostetuilla PDA-maljoilla kasvoi DCBD-GB1-HFBI-konstruktion transformanteista 12 ja DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion transformanteista 13. Kyseiset näytteet, jotka tarkastettiin PCR-reaktiolla, olivat vielä ns. sekapopulaatioita ja ne pyrittiin puhdistamaan yksittäisiksi transformanteiksi selektiomaljalla kahden peräkkäisen laimennos-hajotuksen kautta. Lopulta DCBD-GB1-HFBI- ja DCBD-resiliini-HFBI -konstruktioista siirrostettiin PDA-maljoille 10 ja 6 transformanttia, vastaavasti.

Transformantinäytteet analysoitiin seuraavaksi PCR:llä, jossa tarkistettiin insertin alku- ja loppuosa. DCBD-GB1-HFBI-konstruktion transformantit 16, 17, 20 ja 33 ja DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion transformantit 3, 11, 22 ja 25 antoivat oikean kokoiset DNA-vyöhykkeet AGE-ajossa osoittaen, että insertti löytyi näistä näytteistä. Transformaatiossa insertin kuului integroitua *cbh1*-lokukseen korvaten *cbh1*-geenin. *Cbh1*-deleetio tarkistettiin PCR-reaktiolla. Kaikilla transformanteilla, paitsi DCBD-resiliini-HFBI:n transformantti 3:lla ja 25:llä saatiin *cbh1*-geeni näkyviin. Tulos osoittaa, että vain DCBD-resiliini-HFBI:lle (transformantti 3 ja 25) löytyi puhtaita kantoja ja muissa oli mukana isäntäkantaa. Tästä johtuen (kuva 15) DCBD-GB1-HFBI-konstruktion transformanteille 16, 17, 20 ja 33 tehtiin toisen selektiomaljan jälkeen vielä kolme siirrostusta laimennos-hajotuksen kautta selektiomaljoilla. Tuloksena löytyi transformantti 17/5, joka PCR-reaktion mukaan ei sisällä *cbh1*-geeniä, mutta sisältää halutun insertin. Myös DCBD-R-HFBI-konstruktion transformanteille 11 ja 22 tehtiin vielä kolme siirrostusta laimennos-hajotuksen kautta selektiomaljoilla. Tuloksena ei löytynyt lisää puhtaita kantoja.

DCBD-GB1-HFBI

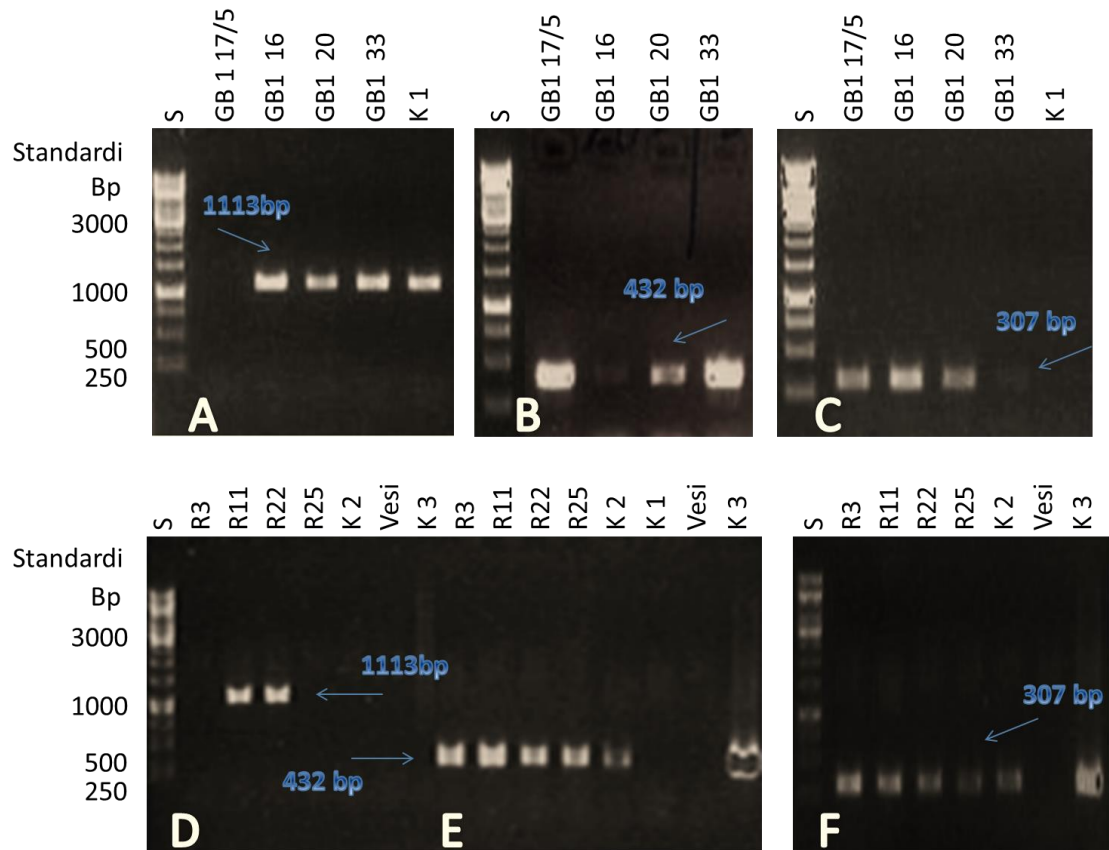


DCBD-Resiliini-HFBI



Kuva 15. Hometransformanttien seulontakaaviot DCBD-GB1-HFBI- ja DCBD-resiliini-HFBI -konstruktioille. Transformantit pyrittiin puhdistamaan yksittäisiksi insertin sisältäviksi klooneiksi kasvattamalla niitä selektiomaljoilla sekä hajottamalla yksittäispesäkkeiksi. PCR-analyysillä tarkastettiin insertin läsnäolo ja *cbh1*-geenin korvautuminen.

Transformanttien oikeellisuuden tarkistus PCR:llä on esitetty kuvassa 16. Tulosten perusteella DCBD-GB1-HFBI-konstruktion transformantti 17/5 ja DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion transformantit 3 sekä 25 sisältävät halutun geenin ja ovat puhtaita yksittäisiä kantoja. DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion transformantti 22 ei ole puhdas kanta.



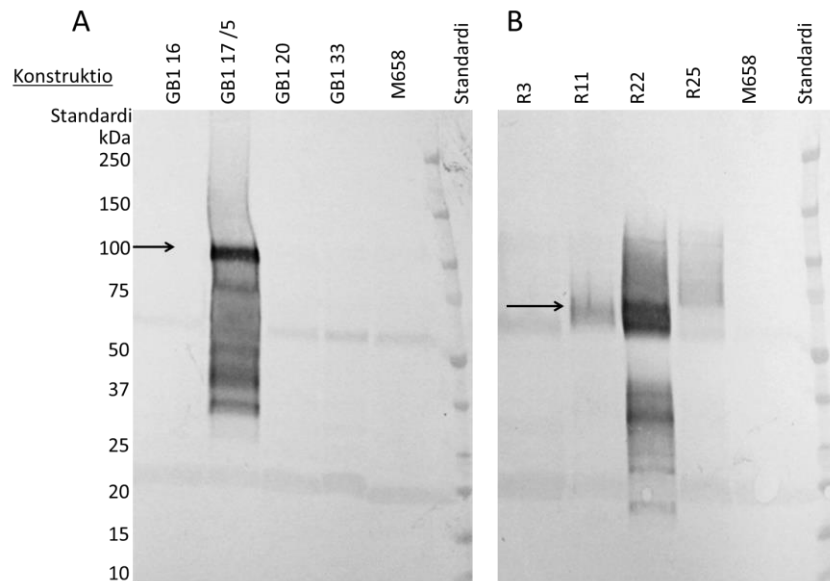
Kuva 16. PCR-reaktioiden tulokset. S on 1 kb DNA-standardi (Fermentas). K 1 on M658 - itiökanta, K 2 on positiivinen kontrolli ja K 3 on pDCBD-resiliini-HFBI -plasmidi. A- ja D-kuvissa on PCR-reaktio *cbh1*-selektiosta, ja vyöhykkeen puuttuminen viittaa tuottokasetin integroitumiseen *cbh1*-lokukseen. A-kuvasta näkyy, että ainoastaan pDCBD-GB1-HFBI-konstruktion transformantti 17/5 antoi oikean, eli negatiivisen tuloksen. D-kuvassa DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion transformantit 3 ja 25 sekä K 2- ja K 3-kontrolli antoivat oikean negatiivisen tuloksen. B- ja E-kuvissa on insertin alkuosan PCR-reaktio. GB1-transformantit 17/5, 16, 20 ja 33 antoivat oikean kokoisen vyöhykkeen. Kuvat C ja F ovat PCR-reaktion tuotteita inserttien loppuosasta. C-kuvassa antavat transformantit GB 17/5, 16 ja 20 vahvan vyöhykkeen geeliajossa sekä transformantit 33 heikon vyöhykkeen. F-kuvassa kaikki DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion transformantit antavat oikean kokoisen vyöhykkeen. Kontrollit antavat oikeat tulokset ja vesi negatiivisen.

5.3 Tuotto

Fuusioproteiinin tuottoa, puhdistusta ja analysointia tarkasteltiin SDS-PAGE-ajolla, Western blot -analyysillä, jossa käytettiin HFBI:n vastaista vasta-ainetta, jos ei toisin mainita, ja UPLC-ajolla.

5.3.1 Erittyvä proteiinituotto

Pienen mittakaavan kasvatuksessa vertailtiin proteiinin tuottoa 4 ml:n kuoppalevykasvatuksissa eri kasvatusalustoilla sekä proteaasi-inhibiittorin vaikutusta kasvatuksessa. Kasvatettavat transformantit valittiin PCR-tarkistuksen perusteella. Vertailuun sisällytettiin konstruktion DCBD-GB1-HFBI:n transformantit 16, 17/5, 20 ja 33, sekä konstruktion DCBD-resiliini-HFBI:n transformantit 3, 11, 22 ja 25. Negatiivisena kontrollina käytettiin M658-kantaa. Kasvatuksessa käytettiin kasvatusalustaa A pH 4,5 (taulukko 6, s. 27). Tulokset analysoitiin Western blot -menetelmällä (kuva 17) neljännen kasvatuspäivän näytteistä. Konstruktion DCBD-GB1-HFBI:n transformanteista vain 17/5 tuotti kohdeproteiinia. DCBD-GB1-HFBI-fuusioproteiinin laskennallinen koko oli 87,1 kDa, mutta western blot -analyysissä se näkyi 100 kDa:n standardin kohdalla. Konstruktion DCBD-resiliini-HFBI:n transformantti 22 tuotti eniten kohdeproteiinia, kun taas transformantit 3, 11 ja 25 tuottivat proteiinia huomattavasti vähemmän. DCBD-Resiliini-HFBI-fuusioproteiinin laskennallinen koko on 47,7 kDa, mutta näkyy geelillä noin 60 kDa:n kokoisena. Molemmat fuusioproteiinit ajautuvat geelillä kokoansa suurempana. Tämä ei ole poikkeuksellista, eteenkään hydrofiilisille toistoyksiköistä koostuville ja rakenteetomille proteiineille, joiden SDS:n sitominen on epätavallista. Toisaalta myös glykosylaatio voi tehdä proteiineista laskettua suurempia. DCBD-resiliini-HFBI:n näytevyöhykkeessä näkyy usein ”hunta”, mikä aiempien julkaisujen mukaan olisi tyypillistä resiliiniproteiineille [71].



Kuva 17. Konstruktioiden DCBD-GB1-HFBI:n transformantit 16, 17/5, 20 ja 33 (A) ja DCBD-resiliini-HFBI:n transformantit 3, 11, 22 ja 25 (B) sekä negatiivinen kontrolli M658, pienen mitta-kaavan kasvatuksen proteiinituoton vertailu Western blot -menetelmällä. Nuolet osoittavat kohdeproteiinien sijainnit. Standardin koot näkyvät kuvan vasemmalla puolella.

Seuraavaksi verrattiin Western blot -analyysissä molempien konstruktioiden parhaiden transformanttien tuottoa eri kasvatusalustoilla eri kasvatuspäivinä. Tulosten perusteella DCBD-GB1-HFBI:n transformantin 17/5 paras tuotto saavutettiin viidennen kasvatuspäivän jälkeen A-kasvatusalustalla, jonka pH oli 5,5 ja vastaavasti DCBD-resiliini-HFBI:n transformantin 22 viidentenä kasvatuspäivänä A kasvatusalustalla pH 4,5:ssä. Konstruktion DCBD-resiliini-HFBI:n transformantti 22 ei ollut puhdas kanta, vaan siinä oli mukana transformoitumatonta M658-kantaa, mikä sisältää *cbh1*-geenin. Proteiinituotossa jatkettiin DCBD-resiliini-HFBI:n transformantilla 22 (nimettiin DCBD-R-HFBI:ksi). DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion transformanteilla 3 ja 25 ei jatkettu, vaikka ne olivat puhtaita kantoja, koska ne tuottivat huonosti (kuva 17). DCBD-GB1-HFBI-konstruktiolla ei jatkettu.

Kaikissa näytteissä on havaittavissa vaihteleva määrä proteaasipilkkoutumista. Molempien proteiinien tuotossa 7 vrk:n kasvatuksen kohdalla proteiini on enemmän hajonnut kuin 5 vrk:n aikana. Proteaasi-inhibiittorien SBTI:n ja pepstatiinin mukanaolo ei tuottanut eroja proteiinien pilkkoutumiseen.

DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion proteiinia tuotettiin pullo- tai fermenttorikasvatuksina ATPS-uuttoa ja preparatiivista käänteisfaasikromatografiaa varten. Kasvatusalustana käytettiin edellä kuvattujen kasvatustulosten perusteella A-alusta pH 4,5. Lisäksi kasvatusalustassa käytettiin proteaasi-inhibiittoreita, koska havaittiin proteolyyttistä hajoamista.

Proteiinituottotasoa määritettiin UPLC:llä vertailemalla HFBI-proteiinin standardinäytteisiin. DCBD-R-HFBI onnistuttiin puhdistamaan pienen mittakaavan affiniteettikromatografialla (kappale 5.5.1, s. 44) ja siten määrittämään tarkka eluutioaika UPLC:ssä näytevyöhykkeen identifioimiseksi. Pullokasvatuksen tuottotaso oli UPLC-ajon perusteella 10 mg/l. Fermenttorikasvatukssa 3. vrk:n proteiinin tuoton määräksi saatiin 35 mg/l ja 4. vrk:n tuotoksi 50 mg/l.

5.3.2 Solun sisäinen proteiinituotto

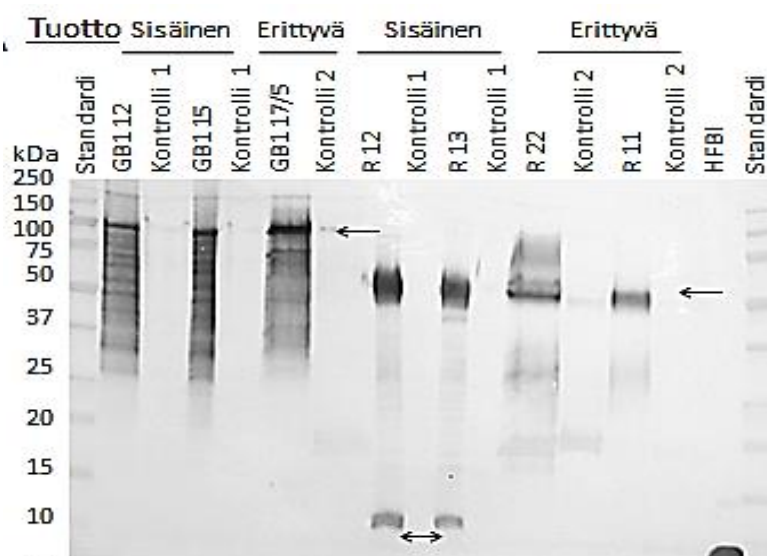
Solun ulkopuolelle erittyvien fuusioproteiinien tuottoa haluttiin vertailla tuottotapaan, jossa proteiini ohjataan jäämään solun endoplasmiseen verkostoon ns. ER-signaalin avulla. Solun sisäisesti tuottavia transformanteja vertailtiin pullokasvatuksina. Vertailuun otettiin transformantit DCBD-GB1-HFBI-ER 12, 15 ja 19 sekä DCBD-resiliini-HFBI-ER 12, 13 ja 20 sekä negatiivisena kontrollina M122-kanta. Kasvatuskokeiluissa käytettiin 350 ml:n määrissä alustoja A pH 4,5 ja B pH 5,2 (taulukko 6, s. 27). Näytteille, jotka otettiin kasvatuksista eri tuottopäivinä, tehtiin Western blot -analyysi. Eri kasvatusalustojen ja fuusioproteiinien transformanttien proteiinientuotossa ei havaittu suuria eroja. DCBD-GB1-HFBI-ER-konstruktion transformantilla 15 saatiin tuotettua proteiinia parhaiten 4 vrk:n kasvatuksen jälkeen, mutta yhdistelmäproteiini pilkkoutuu useiksi vyöhykkeiksi (kuva 17, s. 38). DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktion transformanteilla 12, saatiin proteiinia tuotettua eniten 3. vrk:n kohdalla ja proteiini näkyy geelillä pääosin yhtenä vyöhykkeenä, vaikkakin 10 kDa:n kohdalla näkyy katkennut HFBI-proteiinin kokoinen fragmentti. Tuottokasvatuksen myseelit kerättiin talteen -80°C :seen, puhdistusta ja analysointia varten. DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktion transformantin 12 myseelin kuivapainoksi saatiin 12,67 g /l. DCBD-GB1-HFBI-ER-konstruktion transformanttien kuivapainoja ei määritetty.

DCBD-GB1-HFBI-konstruktion transformantille 17/5 sekä DCBD-GB1-HFBI-ER-konstruktion transformanteille 12 ja 15 tehtiin Western blot -analyysi käyttäen Anti-Strep-tactin vasta-ainetta, joka tunnistaa proteiiniin lisätyn lyhyen Strep-tag-sekvenssin. Vasta-aine ei tunnistanut näytteissä mitään, mikä viittaa proteolyyttiseen hajoamiseen

tai vasta-aineen tunnistusta estävään proteiinikonformaatioon. DCBD-resiliini-HFBI- ja DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktioiden transformanteilla detektio tapahtui odotetusti.

5.3.3 Erittyvän ja solun sisäisen proteiinituoton vertailu

Haluttiin vertailla tuottotasoa suuruutta ja tuotetun proteiinin puhtautta eritetyn ja solun sisäisen tuoton välillä. Vertailtavana oli sisäisen tuoton DCBD-GB1-HFBI-ER-konstruktion transformantit 12 ja 15 sekä M122 -kontrolli, jotka oli kasvatettu pH 5,2:n B-kasvatusalustalla 5 vrk:tta ja eritetyn tuoton DCBD-GB1-HFBI-konstruktion transformantti 17/5 ja M658-kontrolli, jotka oli kasvatettu pH 5,5:n A-kasvatusalustalla 5 vrk:tta. Sisäisen tuoton DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktin transformantit 12 ja 13 sekä M122-kontrolli, jotka oli kasvatettu pH 5,2:n B-kasvatusalustalla 4 vrk:tta ja eritetyn tuoton DCBD-resiliini-HFBI:n transformantit 22 ja 11 sekä M658 -kontrolli, jotka oli kasvatettu pH 4,5:n A-kasvatusalustalla 5 vrk:tta, olivat vertailtavina. Vertailu tehtiin Western blot -analyysillä (kuva 18). Vertailtaessa eritettyä ja solun sisäistä proteiinituottoa DCBD-GB1-HFBI:n transformantti 17/5 tuottuu paremmin solun ulkopuolelle eritettynä kuin solun sisäisesti tuotetut transformantit 12 ja 15. Lisäksi geelillä saatu vyöhyke ei ole niin pilkkoutunut kuin solun sisäisessä tuotossa. DCBD-resiliini-HFBI:n transformantit 12 ja 13 solun sisäisesti tuotettuna antavat voimakkaamman vyöhykkeen, kuin eritetyn tuoton transformantit 11 ja 22. Toisaalta solun sisäisesti tuotetut proteiinit ovat enemmän pilkkoutuneita.



Kuva 18. Proteiinituoton vertailu solun sisäisen tuoton ja solusta erittyneen tuoton välillä. Western blot -analyysi proteiinituotosta. GB1 12 ja GB1 15 ovat DCBD-GB1-HFBI-ER- konstruktion transformantit 12 ja 15 solun sisäisessä tuotossa sekä GB1 17/5 on DCBD-GB1-HFBI-konstruktion eritetyn tuoton transformantti 17/5. R 12 ja R 13 ovat DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktion transformantit 12 ja 13 sisäisessä tuotossa sekä R 22 ja R 11 ovat DCBD-resiliini-HFBI eritetyn tuoton transformantit 22 ja 11. Kontrollikannat ovat sisäisessä tuotossa M122 ja eritetyssä tuotossa M658. Proteiinien pilkkoutumattomat muodot on osoitettu nuolella, sekä DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktion sisäisen tuoton pilkkoutuneet fragmentit kaksoisnuolella.

Solun sisäisten proteiinientuotossa jatkettiin DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktion transformantti 12:lla (nimettiin DCBD-R-HFBI-ER). DCBD-GB1-HFBI-ER-konstruktiolla ei jatkettu, koska solun sisäinen proteiinituotto GB1-konstruktiolla oli alhaisempaa kuin ulkoinen tuotto. Erittyvässä proteiinituotossa jatkettiin transformantilla DCBD-resiliini-HFBI 22 (nimettiin DCBD-R-HFBI:ksi). DCBD-GB1-HFBI-konstruktiolla ei jatkettu. GB1-konstruktioiden Strep-tag-puhdistuskahva ei toiminut pienelläkään tasolla, mikä hankaloitti puhdistusta ja analysointia.

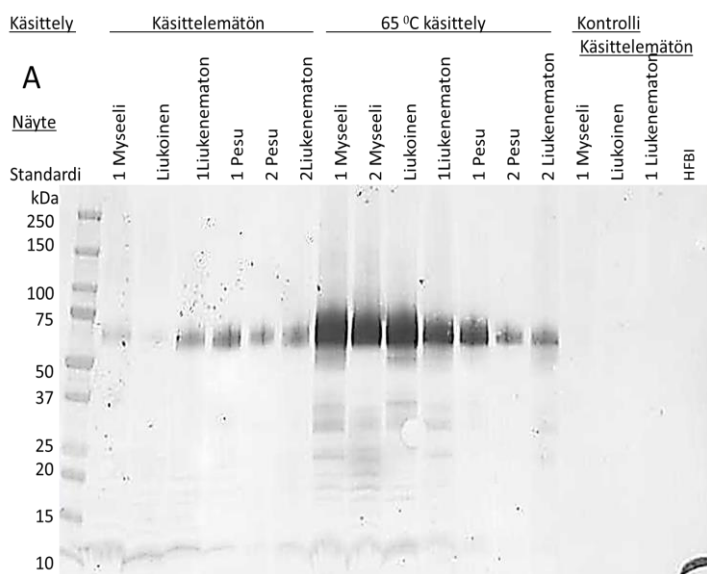
5.4 Pienen mittakaavan puhdistuskokeet

Proteiinit puhdistettiin hajotetuista homemyseleistä sekä kasvatusliuoksesta käyttäen kaksifaasiuuttoa. Analysoinnissa käytettiin Western blot -analyysiä. Jatkoon otettiin DCBD-R-HFBI erittyvä proteiini sekä DCBD-R-HFBI-ER sisäisen tuoton proteiini.

5.4.1 Solun sisäisesti tuotetun proteiinin liukoisuuskoe ja käsittelyt

Liukoisuuskoe suoritettiin, jotta saataisiin selville olosuhteet solujen hajotukselle ja kyseisten proteiinikonstruktioiden liukoisuudelle. Kasvatusalustoista tehtyjä tuotteita yhdistettiin liukoisuuskoea varten. Myseelit hajotettiin mekaanisella lasihelmihajotuksella eri puskureilla pH:ssa 5,5, 6,5, 7,4 ja 8,0. Western blot -analyysin mukaan proteiinit liukenevat sitä paremmin, mitä korkeampaa pH:ta käytettiin. Paras liukoisuus saatiin pH 8:ssa, vaikka tällöinkin liukenemattonta proteiinia jäi runsaasti. Liuksen pH voi vaikuttaa moneen tekijään proteiinin eristämisessä myseelistä, kuten solurakenteiden rikkoutumiseen tai suoraan proteiinin vesiliukoisuuteen. Tätä mekanismia ei kuitenkaan tutkittu tarkemmin tässä työssä.

Liukoisuuden parantamiseksi tarkasteltiin lämpötilan vaikutusta DCBD-R-HFBI-ER -proteiinin liuotukseen myseelistä +65 °C, +75 °C ja +95 °C:ssa. Myseelin kuumennuskäsittely paransi liukoisuutta +65 °C:ssa (kuva 19), ja myös muissa lämpötiloissa. Lisäksi pesuissa liukenemattomasta osuudesta saatiin irrotettua proteiinia liukoiseen osaan.

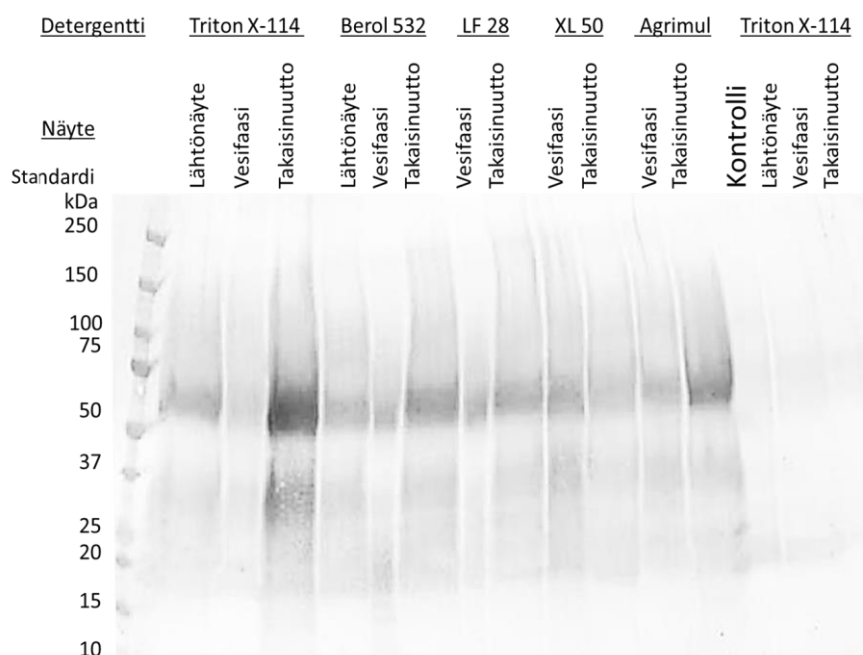


Kuva 19. DCBD-R-HFBI-ER-konstruktion liukoisuus myseelin hajotuksen jälkeen +65 °C:n kuumennuslämpötilassa, tarkisteltuna Western blot -analyysissä. Kuvassa näytenimet vastaavat järjestyksessä seuraavina näytteitä 1 hajotettu myseeli, 2 hajotettu myseeli käsittelyn jälkeen, liukoinen osuus, 1 liukenematon osuus ennen pesuja, 1 pesun supernatantti, 2 pesun supernatantti. ja pesujen jälkeinen 2 liukenematon osuus.

5.4.2 Kaksifaasiuutto

Erittyvän proteiinin puhdistus

Kaksifaasiuutolla puhdistettiin tuotetut yhdistelmäproteiinit muista tuoton aikana erittyvistä proteiineista. DCBD-R-HFBI-proteiinin pullokasvatukselle tehtiin kaksifaasiuutokokeita 1 ml:n mittakaavassa. Uutossa käytetyt detergentit olivat 4-%:nen Triton X-114, 2-%:nen Agrimul NRE 1205 ja 2-%:nen Berol 532, 4-%:nen LF 28 ja 2-%:nen Lutensol XL-50. Kaksifaasiuutossa näyte sekoitetaan detergentin kanssa ja seurataan kohdeproteiinin siirtymistä muodostuvaan detergenttifaasiin. (ks. Työn teoria -osuudesta kappaleesta 3.3). Uutoista ajettiin Western blot -analyysit lähtönäytteistä, uuton vesifaasista ja detergenttiuuton takaisinuutosta. Parhaat puhdistumiset DCBD-R-HFBI:lla saavutettiin detergenteillä Triton X-114 ja Agrimul NRE (kuva 20).



Kuva 20. DCBD-R-HFBI-proteiinin uuttokokeet Western blot -menetelmällä analysoituina. Kontrollinäytteenä on M658 -kannan näyte.

5.5 Preparatiivinen puhdistus ja analysointi

Proteiinit puhdistettiin kasvatusliuoksesta sekä homeen myseeleistä käyttäen kaksifaasiuuttoa ja kromatografisia menetelmiä. Analysoinnissa käytettiin SDS-PAGE-ajoa,

Western blot -analyysimenetelmää, UPLC-ajoa ja MALDI-määrittystä. Jatkoon otettiin konstruktio DCBD-R-HFBI erittyvästä tuotosta sekä konstruktio DCBD-R-HFBI-ER solun sisäisestä tuotosta. Molemmat resillinikonstruktiot valittiin jatkoon, solun sisäisen tuoton ollessa hyvä, mutta toisaalta solun ulkopuolelle tuotettavan proteiinin puhdistus on helpompaa.

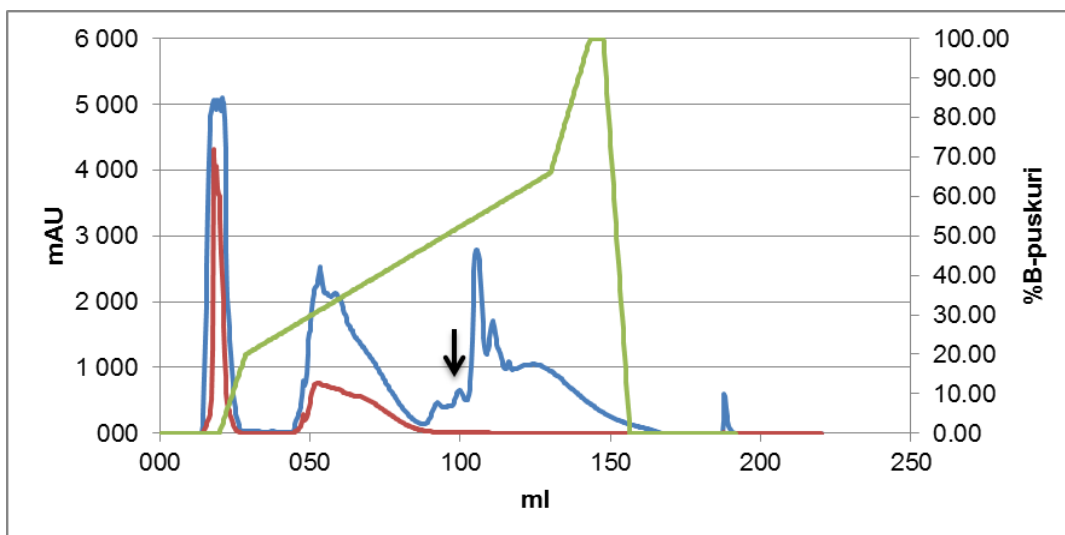
5.5.1 Erittyvän proteiinin puhdistus ja analysointi

Affiniteetikromatografia

DCBD-R-HFBI-proteiinin 350 ml:n tuottokasvatuksesta otettiin 40 ml:n näyte, jonka pH säädettiin 7:ksi 5 M NaOH -liuoksella ja sitten puhdistettiin Strep-trap-affiniteettipylväässä. Ajossa saatiin eluutiopiikki fraktion 12 kohdalla. Ajonäytteistä määritettiin Western blot -analyysi ja UPLC-ajo. UPLC-ajossa yhdistelmäproteiini detektoitiin affiniteetikromatografian eluutiofraktiosta 4,200 min eluutioajan kohdalla ja saannoksi saatiin 0,03 mg proteiinia. Strep-trap-pylväskromatografia (liite 1, kuva 1) ei onnistunut hyvin, koska vain noin 10 %:a proteiinista tarttui pylvääseen. Syinä voivat olla Strep-tagin proteolyttinen pilkkoutuminen tai epäedulliset sitoutumisolosuhteet kasvatusalustasta johtuen.

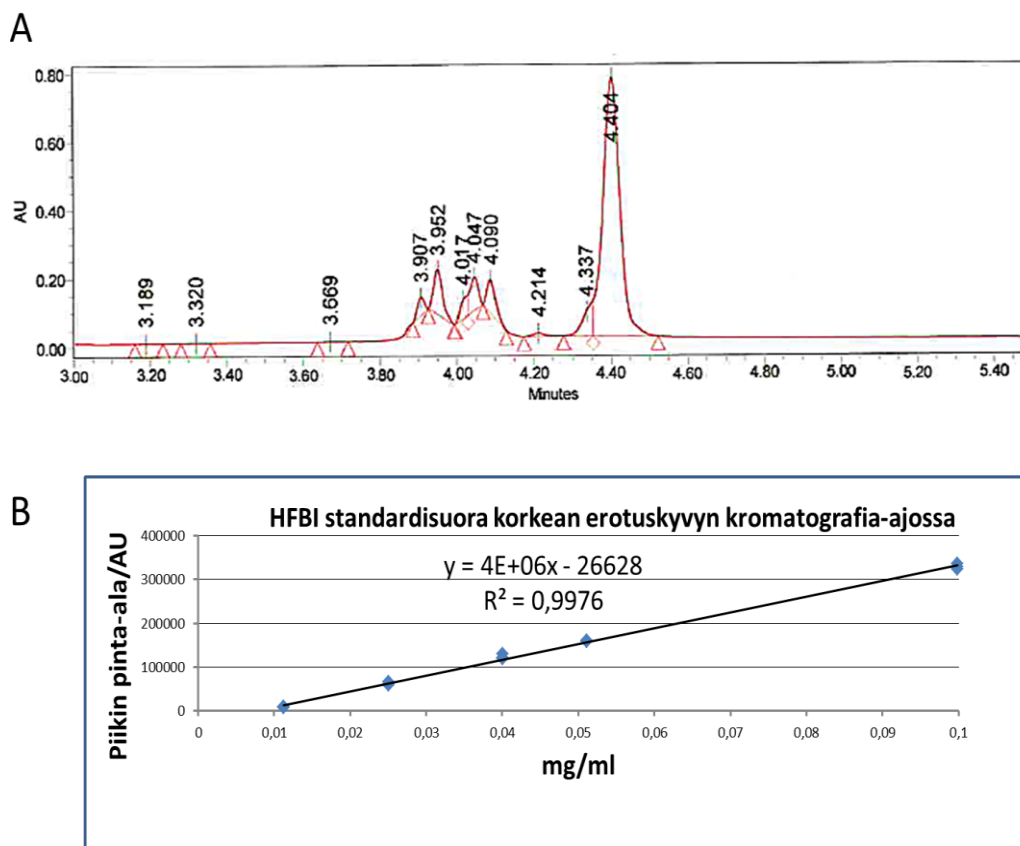
ATPS ja käänteisfaasikromatografia

Fermenttorikasvatuksella tuotetun DCBD-R-HFBI:n 2 l:n erä puhdistettiin 4-%:sella Triton X-114 detergentillä ATPS-uutossa. Näyte jaettiin kolmeen erotus-suppiloon, jossa kaksifaasiuutto suoritettiin. Tulokseksi saatiin 800 ml puhdistettua takaisin uutettua näytettä. Kaksifaasiuutolla suoritettu suuren mittakaavan puhdistus ei onnistunut niin hyvin kuin pienen mittakaavan puhdistus, ja osa proteiinista ei siirtynyt uuttovaiheessa detergenttifaasiin. Proteiininäytteestä ajettiin 10 ml:n erä preparatiivisella käänteisfaasiajolla (kuva 21). Näytteet ajettiin Western blot -analyysissä ja tuloksen perusteella eluutiofraktiot yhdistettiin. Proteiini eluoitui 100 ml ajotilavuudessa, 52-%:sessa B-puskurin konsentraatiossa.



Kuva 21. Käänteisfaasiajo DCBD-R-HFBI-proteiinin kaksifaasiuutetulle fermenttorikasvatukselle. Sininen kuvaa absorbanssia 280 nm (mm. proteiinit) ja punainen on 375 nm:n (pigmentti) aallonpituudella (asteikko kuvan vasemmalla puolella). Vihreä, jonka asteikko on kuvan oikealla puolella, kuvaa B-puskurin pitoisuutta.

Yhdistetyt eluutiofraktiot analysoitiin UPLC:lla (kuva 22 A), jonka 4,404 min eluutioajan piikin pinta-alasta voitiin laskea puhdistetun näytteen pitoisuus. Pitoisuuden määrittämiseksi käytettiin HFBI-standardisuoraa (kuva 22 B). Pitoisuuden perusteella määritettiin 10 ml erän käänteiskromatografiapuhdistuksen saannoksi 1 mg proteiinia. Fermenttorikasvatuksesta puhdistetun proteiinin eluutioaika on hieman eri kohdalla kuin aiemmin pullokasvatuksesta puhdistetun proteiinin eluutioaika (4,200 min), johtuen mahdollisesti erilaisesta glykosyloinnista tai proteolyttisestä hajoamisesta.



Kuva 22. UPLC-ajo DCDB-R-HFBI-proteiinin käänteisfaasiajossa puhdistetusta näytteestä (A). Fuusioproteiinin eluutioaika on 4,404 min. Proteiinimäärän laskemiseen käytetty HFBI-standardisuora (B).

Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio -määritys

Fermenttorikasvatuksessa tuotettu ja ATPS-utettu sekä preparatiivisella käänteisfaasi-ajolla puhdistettu DCBD-R-HFBI-proteiini analysoitiin MALDI:lla. Tulokseksi saatiin liitteen 2 mukaiset massat. Ajossa saaduista piikeistä ei löydy erittyvänä tuotetun proteiinin (47 689,2 Da) kokoista piikkiä. Parhaimmin näkyvät piikit ovat pienempiä ja vastaavat massoja 26 279,3 ja 31 029,3 m/z ja ovat mahdollisesti hajonnutta proteiinia. Tarkkaa syytä piikkien puuttumiselle ei tiedetä, mutta resiliini saattaa soveltua huonosti MALDI-ajoon, kuten todettu aikaisemmassa tutkimuksessa [72].

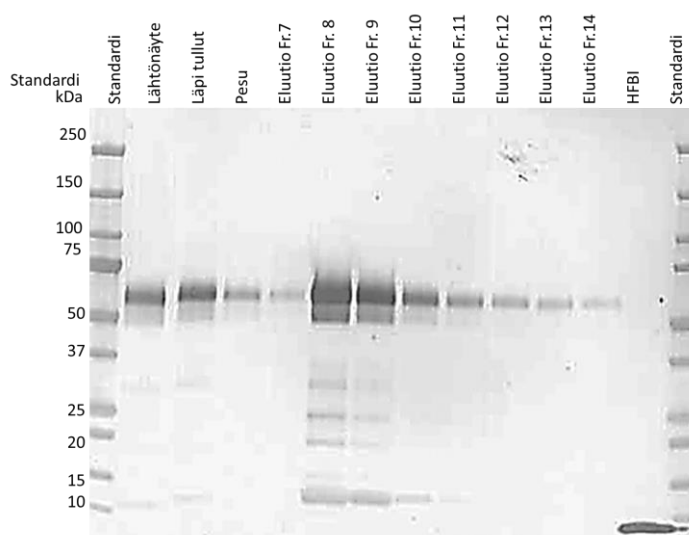
5.5.2 Solun sisäisesti tuotetun proteiinin puhdistus ja analysointi

Fuusioproteiinin analysointia varten DCBD-R-HFBI-ER-konstruktion myseeliä puhdistettiin 4 g:n erä, joka jaettiin 40:een 2 ml:n mikrosentrifugointiputkeen (100 mg/putki). Hajotuksen jälkeen saatua seosta kuumennettiin +65 °C:ssa lämpöhauteessa, 40 min

ajan. Käsittelyn jälkeen liukoinen proteiini erotettiin pelletistä sentrifugoimalla ja pelletti pestiin kaksi kertaa puskurilla. Liukoinen proteiini ja pesuissa oleva proteiini yhdistettiin, jolloin saatiin 145 ml näytettä. Western blot -analyysin perusteella saatiin liukoista proteiinia puhdistukseen. Liukenemattomaan osaan jäi myseelistä proteiinia, mahdollisesti johtuen suuresta myseelimäärästä putkea kohden. Näytteestä puhdistettiin 75 ml:n erä affiniteetikromatografia-ajossa.

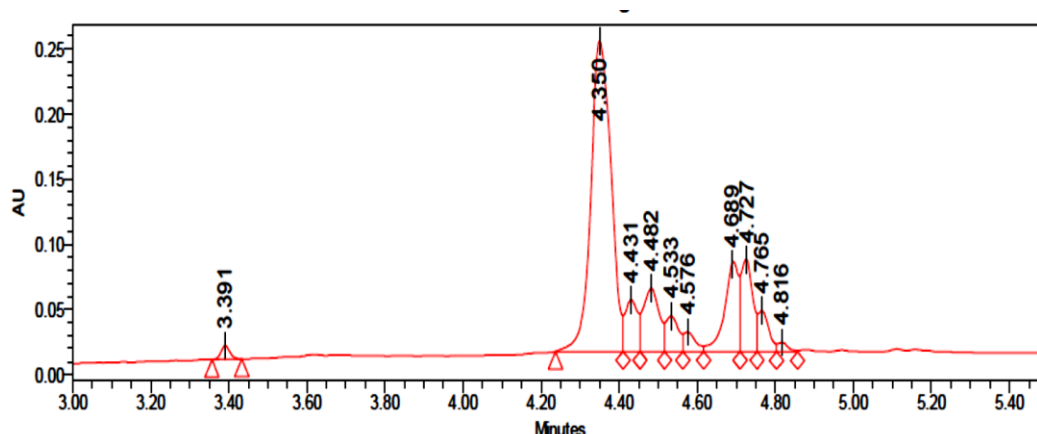
Affiniteetikromatografia-ajo

Puhdistusajo suoritettiin 1 ml:n Strep-Tactin pylväällä (liite 1, kuva 2). Western blot -analyysin (kuva 23) ja SDS-Page-ajon tulosten perusteella yhdistettiin eluutiofraktiot 8–10. Geelikuvan perusteella affiniteetikromatografia-ajossa proteiinia ei tarttunut pylvääseen kuin pieni määrä, kuten havaittiin myös erittyvien proteiinien affiniteetikromatografia-puhdistusajossa (kappale 5.5.1, s. 44).



Kuva 23. DCBD-R-HFBI-ER-proteiinin affiniteetikromatografia-ajon näytteistä ajetut Western blot -analyysi. Geelissä ajettu näytteet ovat seuraavassa järjestyksessä: standardi, lähtönäyte, sitoutumaton, pesunäyte, eluutiofraktiot 7–14, HFBI kontrolli ja standardi.

Affiniteetikromatografia-ajon tuloksena saadut ja yhdistetyt eluutiofraktiot analysoitiin UPLC-ajolla (kuva 24). Ajosta saadusta 4,350 min eluutioajan piikin pinta-alasta voitiin laskea puhdistetun näytteen saannoksi 0,6 mg, käyttäen hyväksi HFBI-standardisuoraa (kuva 22 B).



Kuva 24. UPLC-ajo DCBD-R-HFBI-ER-proteiinin affiniteettikromatografia-ajosta eluoiduista näytteistä. Tulosten perusteella fuusioproteiiniinkin eluutioaika on 4,350 min.

Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio

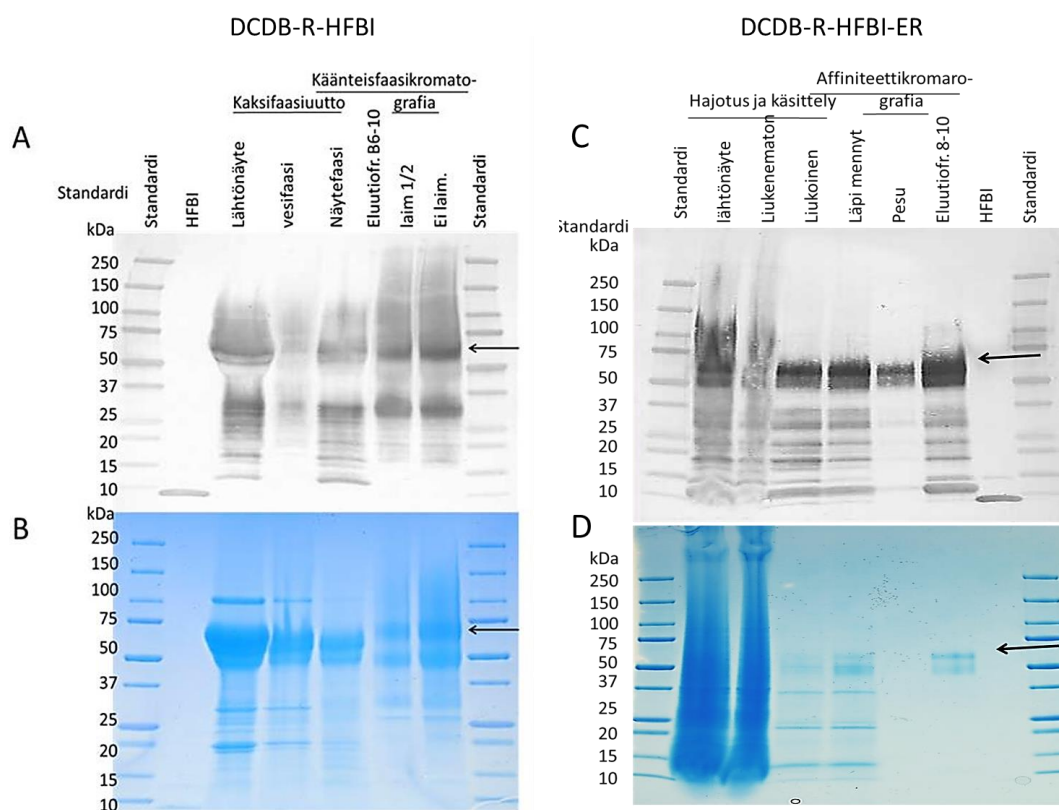
DCBD-R-HFBI-ER-proteiini, joka oli puhdistettu affiniteettikromatografiaa käyttäen liukoisesta ja käsitellystä myseelistä analysoitiin MALDI:lla. Tulokseksi saatiin liitteen 3 mukaiset piikit, joiden arvot ovat luettelossa käyrien alapuolella. Saaduista piikeistä ei löydy solun sisäisesti tuotetun proteiinin (42 293,8 Da) kokoista piikkiä. Parhaiten näkyvä piikki on 19 910,9 m/z kohdalla. Kuten todettu kohdassa 5.5.1, s. 46 resiliini saattaa soveltua huonosti MALDI-analyysiin.

5.5.3 Erittyvän ja solun sisäisesti tuotetun puhdistuksen vertailu

Solun ulkopuolelle erittyvä DCBD-R-HFBI-fuusioproteiini puhdistettiin kaksifaasiuutolla ja preparatiivisella käänteisfaasiajolla. Solun sisäisesti tuotettava DCBD-R-HFBI-ER-fuusioproteiini puhdistettiin myseelin käsittelyllä ja affiniteettikromatografialla.

Erittyvän tuoton DCBD-R-HFBI-proteiinin ja sisäisesti tuotetun DCBD-R-HFBI-ER-proteiinin puhdistuksen kulusta suoritettiin Western blot -analyysi ja SDS-PAGE-ajo. Kuvan 25 (A ja B) mukaisesti DCBD-R-HFBI:n lähtönäytteessä näkyy isäntäsolun tuottamaa sellulaasia, koska transformanti-kantaa ei saatu puhtaaksi isäntäkannasta. Puhdistus kaksifaasiuutolla toimii, muttei konsentroinut proteiinia hyvin. Käänteisfaasiajosta saadussa eluutiofraktioissa ei SDS-PAGE-ajon mukaan puhdistumista tapahtunut hyvin. DCBD-R-HFBI-ER saatiin hyvin myseelistä (lähtönäyte) liukoiseksi (kuva 25 C ja D). Affiniteettikromatografia Strep-tag-puhdistuskahvaa käyttäen ei onnis-

tunut hyvin. Syynä voi olla suuri ylimäärä proteiinia ja isäntäsolun proteaasit, jotka ovat pilkkoneet kahvan. Proteiini saatiin puhdistettua hyvin, mutta saanto jäi huonoksi.



Kuva 25. Erittyvän (A ja B) ja sisäisesti tuotettujen (C ja D) fuusioproteiinien puhdistus. Erittyvän tuoton DCBD-R-HFBI-proteiinin puhdistus kaksifaasiuutolla ja käänteisfaasikromatografialla. Western blot -analyysissä (A) ja SDS-PAGE-ajossa (B) ATPS lähtönäyte, vesifaasi ja näytefaasi, joka on lähtönäyte käänteisfaasiajoon. Eluutionäytteet, puolilaimennos ja laimentamaton näyte, ovat kromatografia-ajossa puhdistetut näytteet. Puhdistettu fuusioproteiini on osoitettu kuvassa nuolella. HFBI on kontrollinäyte. Solun sisäisesti tuotetun DCBD-R-HFBI-ER-proteiinin puhdistus myseelin hajotuksella ja käsittelyllä sekä affiniteetikromatografialla. Western blot -analyysissä (C) ja SDS-PAGE-ajossa (D) myseeli-lähtönäyte sekä käsittelyn liukenematon ja liukoinen osuus. Affiniteetikromatografian näytteet ovat edellä mainittu liukoinen osuus lähtönäytteenä, läpimennyt, pesu ja eluutiofraktiot. Puhdistettu fuusioproteiini on osoitettu kuvassa nuolella. HFBI on kontrollinäyte

Erittyvän ja sisäisesti tuotetun resiliini-fuusioproteiinien tuoton ja puhdistuksien yhteen-veto on esitetty taulukossa 8. Tuottotasot ovat laskettu UPLC-ajossa saadun piikin pin-ta-alasta käyttäen HFBI-standardisuuraa. Erittyvän tuoton DCBD-R-HFBI-proteiinin saanto on saatu kappaleen 5.5.1, s. 44 mukaisesta puhdistuksesta. Solun sisäisen

tuoton DCBD-R-HFBI-ER-proteiinin saanto on saatu kappaleen 5.5.2, s. 46 mukaisesta puhdistuksesta.

Taulukko 8. Tuotettujen ja puhdistettujen resiliini-fuusioproteiinien saanto.

Konstruktio	Kasvatus	Tuotto- taso	Puhdistus	Saanto
DCBD-R-HFBI, erittyvä tuotto	7 l fermentointi	50 mg/l	Preparatiivinen käänteisfaasikromatografia	1 mg
DCBD-R-HFBI-ER, sisäinen tuotto	350 ml pullokasvatus	40 mg/l	Affiniteetikromatografia	0,6 mg

Tuloksista nähdään, että käytetyillä puhdistusmenetelmillä suuri osa kohdeproteiinista häviää. Vertailtaessa erittyvän ja sisäisen resiliiniproteiinituoton puhdistusta keskenään (kuva 25 sekä taulukko 8) voidaan todeta, että solun sisäisesti tuotettu proteiini puhdistuu muista erittyvistä proteiineista puhtaammaksi kuin solusta ulos erittyvä proteiini. Solun sisäisen proteiinin puhdistuksen suorittaminen isommassa määrässä on kuitenkin vaikeaa, myseelin hajotuksesta johtuen. Fuusioproteiinien tuottotasot molemmilla tuoton tavoilla olivat alhaisia ja näin puhdistusten saannot jäivät hyvin pieniksi.

6 Yhteenveto ja loppupäätelmät

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kloonata, tuottaa, puhdistaa ja analysoida elastiset yhdistelmäproteiinit, jotka koostuivat kahdesta selluloosaan sitoutuvasta domeenista, hydrofobiiniproteiinista sekä resiliini- tai GB1-domeenista. Tavoitteena oli tuottaa nanokomposiittimateriaaleissa käytettäviä joustavia proteiineja, joilla voidaan vaikuttaa materiaalien ominaisuuksiin.

Kloonaus suoritettiin käyttämällä yhden reaktion Golden Gate -menetelmää. Yhdistelmäplasmidit transformoitiin *E. coli* -soluihin ja konstruktioplasmidit tarkistettiin restriktioentsyymidigestiolla ja sekvensoimalla. Konstruktiot transformoitiin *T. reesei* -homeeseen partikkelipommituksella. Puhtaksi yksittäisiksi kannoiksi saatiin yksi DCBD-GB1-HFB1-konstruktion transformantti ja kaksi DCBD-resiliini-HFB1-konstruktion transformanttia. Useasta selektiomaljauksesta huolimatta puhdaskantoja

oli vaikea saada transformanteista. Syynä tähän on mahdollisesti käytetty voimakkaasti muokattu homekanta ja partikkelipommitukseen liittyviä tuntemattomia seikkoja.

Opinnäytetyössä fuusioproteiinit tuotettiin *T. reesei* -homeessa kahdella eri tavalla, solusta erittyvinä ja solun sisäisesti tuotettuna. Solusta erittyvät proteiinikonstruktiot valmistettiin opinnäytetyön aikana ja solun sisäisesti tuotetut proteiinikonstruktiot saatiin valmiina käyttöön. Fuusioproteiinit tuottuivat homeessa, vaikka proteiinien useat toistojaksot olisivat voineet tuottaa ongelmia. Tuottotasot jäivät kuitenkin melko alhaisiksi molemmissa tuottotavoissa, ja näytteissä oli havaittavissa vaihteleva määrä proteaasipilkkoutumista. Erittyvän tuoton DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion SDS-PAGE näytevyöhyke ajautui laajana huntumaisena alueena, mikä on tyypillistä resiliini-proteiineille. Solun sisäisesti tuotettu DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktion proteiini tuottui paremmin kuin erittyvä proteiini, mutta oli enemmän pilkkoutunut. Erittyvä DCBD-GB1-HFBI-konstruktion proteiini tuottui paremmin kuin solun sisäisesti tuotettu proteiini, ja oli vähemmän pilkkoutunut.

Tässä työssä homekasvatuksissa tuotetut proteiinit puhdistettiin ensin pienen mittakaavan kokeissa. Analysoinnissa käytettiin Western blot -menetelmää. Solun sisäisesti tuotetut proteiinit saatiin liukoiseksi myseelin hajotuksella. Kokeissa testattiin oikeat olosuhteet hajotukseen ja sen jälkeiseen käsittelyyn. Kokeissa saatuja tuloksia käytettiin preparatiivisessa puhdistuksessa solun sisäisesti tuottuville DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktion proteiineille. Pienen mittakaavan puhdistuksessa tehtiin kaksifaasiuutokokeiluja eri detergentejä käyttäen, erittyville ja solunsisäisesti tuottuville proteiinikonstruktiolle. Puhdistuksessa parhaiten toimivaa detergenttiä käytettiin preparatiivisessa puhdistuksessa erittyville DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion proteiineille. Aiempien havaintojen mukaan kaksifaasiuutossa isot proteiinit toimivat huonosti. Uuttumiseen saattaa vaikuttaa detergentti-misellirakenteiden koko etenkin suhteessa uutettavan proteiinin kokoon ja hydrofobisuuteen. Toisaalta puhdistuksen uuttomekanismia ei täysin tunneta.

Erittyvää DCBD-resiliini-HFBI-konstruktion proteiinia puhdistettiin affiniteettipylvasajossa, mutta vain pieni osa proteiinista sitoutui pylvääseen. Western blot -analyysissä Strep-tagin vasta-aine ei tunnistanut DCBD-GB1-HFBI-konstruktion näytteissä mitään, mikä viittaa Strep-tag-peptidin proteolyyttiseen hajoamiseen tai tunnistusta estävään konformaatioon. Tämän vuoksi suuremman proteiinimäärän puhdistus suoritettiin kaksifaasiuutolla ja preparatiivisella käänteisfaasikromatografia-ajolla. Kaksifaasiuuton voitiin havaita toimivan hyvin, mutta puhdistus ei konsentroinut näytettä, kuten oli toi-

vottu. Käänteisfaasikromatografia-ajossa proteiininäytteen puhdistus muista proteiineista ei toiminut hyvin, mikä voidaan havaita SDS-PAGE-ajon proteiinivyöhykkeistä. Käytetty kanta ei ollut ns. puhdaskanta, vaan se sisälsi suuria määriä sellulaasientsyymiä tuottavaa isäntäkantaa, ja tämän sellulaasin suuri määrä luultavasti vaikutti puhdistukseen negatiivisesti. UPLC:llä saatiin käänteisfaasikromatografia-ajon eluutiofraktioista proteiinipiikki, jonka perusteella puhdistuksen saannoksi määritettiin vain 1 mg kohdeproteiinia. Puhdistettu proteiini analysoitiin vielä MALDI:lla, mutta määrittäminen ei antanut oikean kokoista massaa, joka voi olla seurausta resiliinin huonosta soveltumisesta määrittämiseen. Erittyvän DCBD-GB1-HFB1 -konstruktion proteiinin puhdistuksessa tulokseksi saadut proteiinimäärät olivat liian pieniä jatkoanalysoinnin suorittamiseksi.

Solun sisäisesti tuottuva DCBD-resiliini-HFBI-ER-konstruktio puhdistettiin Strep-Tactin pylvällä affiniteettikromatografialla. Affiniteettikromatografia-ajossa vain pieni osa tarttui pylvääseen, ja saatiin siten puhdistettua. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-ajossa puhdistuksen saannoksi saatiin vain 0,6 mg proteiinia. Puhdistettu proteiini analysoitiin MALDI:lla mutta oikean kokoista piikkiä ei havaittu tuloksissa. Solun sisäisen tuoton DCBD-GB1-HFBI-ER-konstruktion proteiinituotto oli alhaisempaa kuin ulkoisen tuoton, ja tästä syystä sitä ei puhdistettu suuremmassa mittakaavassa. Solun sisäisesti tuotettu DCBD-R-HFBI-ER -proteiini puhdistui muista proteiineista tehokkaammin, kuin solusta ulos erittyvä DCBD-R-HFBI-proteiini. Solun sisäisen proteiinin puhdistuksen suorittaminen isommassa määrässä on kuitenkin vaikeaa sillä nykyiset menetelmät myseelin hajotukseen soveltuvat vain suhteellisen pieniin tilavuuksiin. Resiliini-fuusioproteiinien tuottomäärät molemmilla tuoton tavoilla olivat alhaisia ja näin puhdistusten saannot jäivät pieniksi.

Tämän opinnäytetyön tuloksien perusteella elastisten yhdistelmäproteiinien tuottaminen *T. reesi* -homeella on mahdollista, vaikka tuottotasot jäivätkin alhaisiksi. Näiden tulosten perusteella tutkimuksia on jatkettu uudella konstruktiolla, jolla pyritään korkeampiin tuottotasoihin. DCBD-resiliini-HFBI-konstruktio liitetään hyvin tuottuvaan kanta- ja-proteiiniin, joka mahdollistaa paremman tuoton. Tuottotason noston myötä myös proteiinin puhdistuksen uskotaan merkittävästi helpottuvan. Jatkoon valittiin erittyvä ja solun sisäisesti tuottuva resiliinikonstruktio. Mikäli tarvittava määrä yhdistelmäproteiinia saadaan tuotettua ja puhdistettua, päästään tutkimaan elastisten proteiinien vaikutusta komposiittimateriaaleihin sekä kehittämään uusia materiaaleja uusille sovellusalueille.

Lähteet

- 1 Espinosa, H.D., Rim, J.E., Barthelat, F. & Buchler, M.J. 2009. Merger of structure and material in nacre and bone — Perspectives on *de novo* biomimetic materials. *Progress in Materials Science*. Vol. 54, s. 1059–1100.
- 2 Laaksonen, P., Walther, A., Malho, J-M., Kainlauri, M., Ikkala, O. & Linder, M.B. 2011. Genetic engineering of biomimetic nanocomposites: Diblock proteins, graphene, and nanofibrillated cellulose. *Angewandte chemie int. Ed*. Vol. 50, s. 1–5.
- 3 Liu, K. & Jiang, L. 2011. Bio-inspired design of multiscale structures for function integration. *J. Nano Today*. Vol. 6, s. 155–175.
- 4 Eskelinen, H. 2012. Konstruktiomateriaalit. Luennot / syksy, Luento 7, komposiitit. Verkkodokumentti.
<<https://noppa.lut.fi/noppa/opintojakso/bk20a2100/.../komposiitit.pdf>>. Luettu 20. 8. 2013.
- 5 Fratzi, P. 2007. Biomimetic materials research: what can we really learn from nature's structural materials. *J.R. Soc. Interface*. Vol. 4, s. 637–642.
- 6 Laaksonen, P., Szilvay, G.R. & Linder, M.B. 2012. Genetic engineering in biomimetic composites. *Trends in Biotechnology*. Vol. 30(4), s. 191–197.
- 7 Brubaker, C.E., Messersmith, P. B. 2012 The present and future of biologically inspired adhesive interfaces and materials. *Langmuir*. Jan. Vol. 28(4), s. 2200–2205.
- 8 Raula, J. 2010. Biomateriaalit. Verkkodokumentti.
<<http://www.helsinki.fi/farmasia/biofarmasia/opiskelu/provopinnot/Fysfarm12/Bio materiaalit.pdf>>. Luettu 6. 6. 2013.
- 9 Linder, M. & Teeri, T.T. 1997. The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*. Vol. 57, s. 15–28.
- 10 Linder, M. B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä T & Penttilä, M. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 29, s. 877–896.
- 11 Laaksonen, P., Kainlauri, M., Laaksonen, T., Shchepetov, A., Jiang.H., Ahopelto, J. & Linder, M. B. 2010. Interfacial Engineering by Proteins—Exfoliation and Functionalization of Graphene by Hydrophobins. *Angewandte Chemie Int. Ed*. Vol. 49, s. 1–5.

- 12 van der Vegt, W., van der Mei, H. C., Wösten, H. A., Wessels, J. G., & Busscher, H. J. 1996. A comparison of the surface activity of the fungal hydrophobin SC3p with those of other proteins. *Biophys. Chem.* Vol. 57, s. 253–260.
- 13 Wösten, H.A.B., van Wetten, M.A., Lugones, L.G., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. & Wessels, J.G.H. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr. Biol.* Vol. 9, s. 85–88.
- 14 Wessels, J. G. H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol. 32, s. 413–437.
- 15 Askolin, S. 2006. Characterization of the *Trichoderma reesei* Hydrophobins HFBI and HFBI. Väitöskirja. Aalto University Schools of Technology.
- 16 Nakari-Setälä, T., Aro, N., Kalkkinen, N., Alatalo, E. & Penttilä, M. 1996. Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Eur. J. Biochem.* Vol. 235, s. 248–255.
- 17 Linder, M.B., Qiao, M., Laumen, F., Selber, K., Hyytiä, T., Nakari-Setälä, T. & Penttilä, M. 2004. Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. *Biochemistry.* Vol. 43, s. 11873–11882.
- 18 Hakanpää, J., Szilvay, G.R., Kaljunen, H., Maksimainen, M., Linder, M & Rouvinen, J. 2006. Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI—The structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Science.* Vol. 15, s. 2129–2140.
- 19 Weissels, J.G. 1997. Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. *Advances in Microbial Physiology.* Toimittanut. R.K. Poole. Academic Press Ltd London. Vol. 38, s. 1–45.
- 20 Wösten, H.A.B., de Vries, O.M.H. & Wessels, J.G.H. 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell.* Vol. 5, s. 1567–1574.
- 21 Palonen, H., Tenkanen, M. & Linder, M. 1999. Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolases Cel6A and Cel7A and cellulose at equilibrium and during hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65, s. 5229–5233.
- 22 Tomme, P., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G. Gilkes, N.R. 1995. Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties. *ACS Sym. Ser.* Vol. 618, s. 143–163.
- 23 Linder, M., Salovuori, I., Ruohonen, L & Teeri, T.T. 1996. Characterization of a double cellulose-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 271(35), s. 21268–21272.

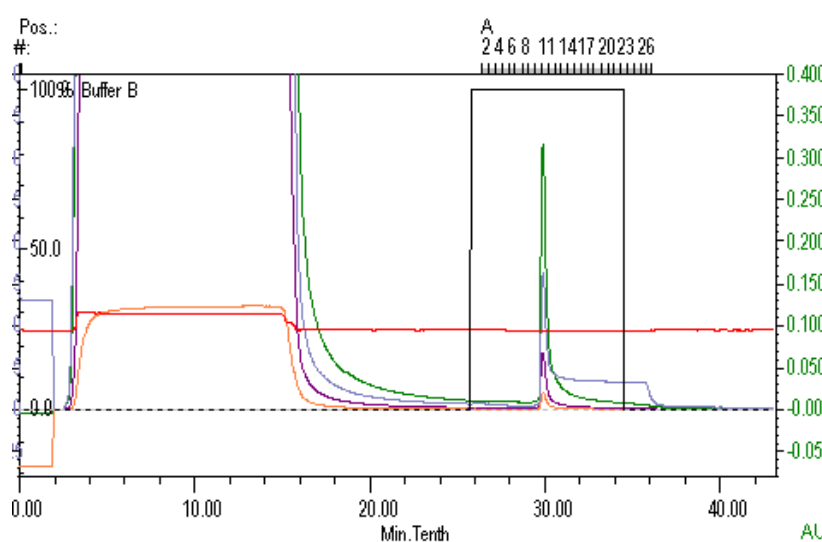
- 24 Kimmorusto. 2006. Histologia. Verkkodokumentti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/valtimot/1/>>. Luettu 20. 8. 2013.
- 25 Shewrey, P.R., Tatham, A.S. & Bailey, A.J. 2002. Elastomeric Proteins: Structures, Biomechanical Properties and Biological Roles. Preface. Cambridge University.
- 26 Tatham, A.S. & Shewry, P.S. 2002. Comparative structures and properties of elastic proteins. Philosophical Transactions R Soc Lond B Biol Sci. Vol. 357(1418), s. 229–234.
- 27 Charati, M.B., Ifkovits, J.L., Burdick, J.A., Linhard, J.G. & Kiick, K.L. 2009. Hydrophilic elastomeric biomaterials based on resilin-like polypeptides. Soft Materials. Vol. 5(18), s. 3412–3416.
- 28 Capello, J., Crissman, J., Dorman, M., Mikolajczak, M., Textor, G., Marquet, M. & Ferrari, F. 1990. Genetic engineering of structural protein polymers. Biotechnol. Prog. Vol.6, s. 198–330.
- 29 Weis-Fogh, T. 1960. A rubber-like protein in insect cuticle. The Journal of experimental Biology. Vol. 37, s. 889–907.
- 30 Andersen, S.O. & Weis-Fogh, T. 1964. Resilin. A rubberlike protein in arthropod cuticle. Advances in Insect Physiology. Vol. 2, s. 1–65.
- 31 Elvin, C.M., Carr, A.G., Huson, M.G., Maxwell, J.M., Pearson, R.D., Vuocolo, T., Liyou, N.F., Wong, D.C.C., Merritt, D.J. & Dixon, N.E. 2005. Synthesis and properties of crosslinked recombinant pro-resilin. Nature. Vol. 437, s. 999–1002.
- 32 Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymar, Niklas. 2002. BIO prosessiteknikka. 1. painos. Helsinki. WSOY.
- 33 Ihminen kopioi luontoa. 2007. Turun sanomat, teemat. Verkkodokumentti.
<<http://www.ts.fi/teemat/sunnuntai/1074218535/Ihminen+kopioi+luontoa.>> Luettu 13.9.2013.
- 34 Bennet-Clark, H. 2007. The first description of resilin. Journal of Experimental biology. Vol. 210, s. 3879–3881.
- 35 Hooke, R. 1665. Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses. First edition. London. Edited by Martyn, M. & Allestry, J.
- 36 Ardell, D. H. & Andersen, S. O. 2001. Tentative identification of a resilin gene in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochem Mol Biol. Vol. 10, s. 965–970.

- 37 Fahnestock, S.R., Alexander, R. Nagle, J. & Filpula, D., 1986. Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G streptococcus. *Journal of Bacteriology*. Vol. 167(3), s. 876–880.
- 38 Gronenborn, A.M. & Clore, G.M. 1993. Structural studies of immunoglobulin-binding domains of streptococcal protein G. *Immunomethods*. Vol. 2, s. 3–8.
- 39 Cao, Y. & Li, H. 2007. Polyprotein of GB1 is an ideal artificial elastomeric protein. *Nature Materials*. Vol. 6, s. 109–114.
- 40 Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. 2008. A One pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*. Vol. 3 (11).
- 41 Makarow, M., Simonen, M. & Ulmanen, I. 1996. Geenistä koeputkien kautta proteiiniä. *Duodecim* 4, s. 325–336.
- 42 Proteiinien tuottaminen. 2006. Solubiologia. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_tuottaminen/2/>. Luettu 6.8.2013.
- 43 Demain, A. L. & Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. Vol. 27, s. 297–306.
- 44 Sienten biologia. 2013. Toimittanut S. Timonen & J. Valkonen. Helsinki. Gaudemus.
- 45 Maras, M., van Die, I., Contreras, R. & Van den Hondel, C. 1999. Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconjugate Journal*. Vol. 16, s. 99–107.
- 46 Ilmen, M., Onnela, M.-L. & Klemsdal, S. 1996. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular & General Genetics*. Vol. 253, s. 303–314.
- 47 The Mycota.2002. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research, Industrial applications X. Edited by K. Esser & J.W.Bennett. E.H.J. Schuren. Heterologous protein production in mycelial fungi. Vol. 21, s. 389–400.
- 48 Paloheimo, M., Miettinen-Oinonen, A., Torkkeli, T., Nevalainen, H. & Suominen, P. 1993. Enzyme production by *Trichoderma* using the *cbh1* promoter. In Suominen, P. and Reinikainen, T. (ed) Proceedings of the TRICEL 93 symposium workshop. Espoo, Finland. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. s. 229–238.
- 49 Punt, P.J., van Biezen, N., Conessa, A., Albers, A., Mangnus, J. & van Hondel, C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnology*. Vol. 20 (5), s. 200–206.

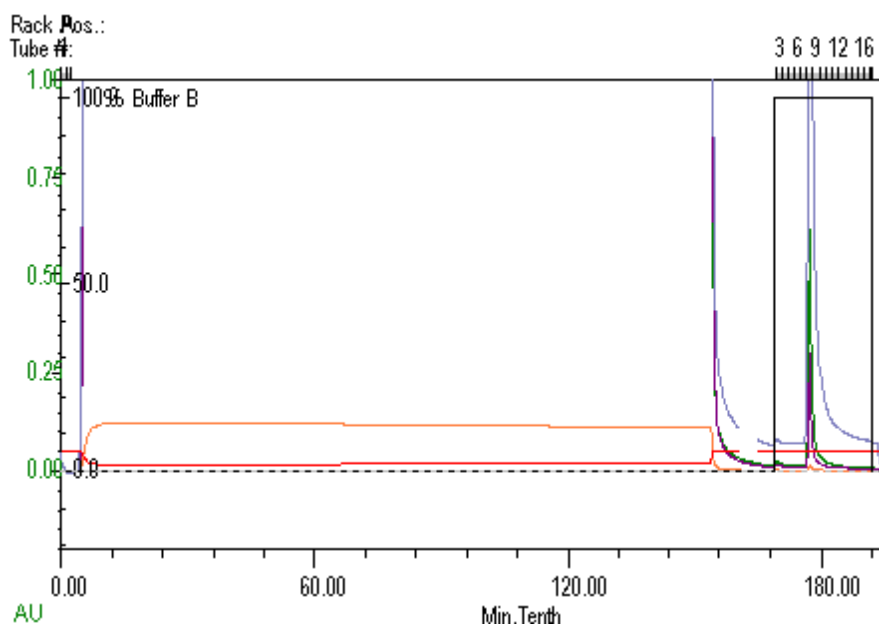
- 50 Penttilä, M., Carmen, L. & Nevalainen, H. 2004. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. Teoksessa Handbook of fungal biotechnology. Second Edition, Revised and Expanded. Vol. 31, s. 710–735. Toimittanut Arora, D.K.
- 51 Mustalahti, E., Salohimo, M. & Joensuu, J. J. 2011. Intracellular protein production in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) with hydrophobin fusion technology. New Biotechnology. Vol. 30 (2), s. 262–268
- 52 Cha, H. J., Shin, H.S., Lim, H. J., Cho, H. S., Dalal, N. N., Pham, M. Q. & Bentley, W. E. 2005. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. Biochemical Engineering Journal. Vol. 24, s. 225–233
- 53 Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen J. 2010. Geenitekniikka. Oppimateriaaleja 52. Turku. Turun Ammattikorkeakoulu.
- 54 Bowyer, P. 2001. DNA-mediated transformation of fungi. Teoksessa Molecular and cellular biology of filamentous fungi. Chapter 3 s. 33. Toimittanut Talbot, N. Oxford University.
- 55 Hynes, Michael J. 1996. Genetic transformation of filamentous fungi. Journal of Genetics. Vol. 75(3), s. 297–311.
- 56 Kelly, J.M. & Hynes, M.J. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulas*. The EMBO journal. Vol. 4(2), s. 475–479
- 57 Gritz, L. & Davies, J. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. Vol 25(2–3), s. 179–188.
- 58 Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. & Knowles, J. 1987. A versatile transformation system for the cellolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene (Amst.). Vol. 61, s. 155–164.
- 59 Fungaro, M.H., Rech, E., Muhlen, G.S., Vainstein, M.H., Pascon, R.C., de Queiroz, M.V., Pizzirani-Kleiner, A.A. & de Azevedo, I.L. 1995. transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. FEMS Microbiol. Lett. Vol. 125(2–3), s. 293–297.
- 60 de Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J. & Beijersbergen, A.G. 1998. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. Vol. 16(9), s. 839–842.
- 61 Stanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. & Allen, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Journal of Particle Science and Technology. Vol. 5, s. 27–37.

- 62 Hazell, B.W., Te'O, V.S.J., Bradner, J.R., Bergquist, P.L. & Nevalainen, K.M.H. 2000. Rapid transformation of high cellulase-producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. Letters in Applied Microbiology. Vol. 30(4), s. 282–286.
- 63 Heiser, W. 1992. Optimization of the biolistic transformation using the helium-driven PDS-1000/He system. Bulletin 1688. Bio-Rad Laboratories. Hercules CA.
- 64 Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System Catalog Numbers 165-2257 and 165-2250LEASE to 165-2255LEASE. Verkkodokumentti. Bio-Rad. <<http://www.bio-rad.com/en-fi/product/pds-1000-he-hepta-systems>>. Luettu 6.8.2013.
- 65 Biolistic Bombardment - Cell or tissue Transformation system. 2012. Verkkodokumentti . The Comparative Genomics Center. <<http://depts.washington.edu/genomelb/BiolisticBombardment&MiscV4.html>>. Päivitetty 12/2012. Luettu 6.8.2013.
- 66 Schmidt, T. & Skerra, A. 2007. The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. Nature Protocols. Vol. 2, s. 1528–1535.
- 67 Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.–6. painos. Helsinki. Edita.
- 68 Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M-R. & Penttilä, M. 2001. The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. Biomacromolecules. Vol.2, s. 511—517.
- 69 Joensuu, J.J., Conley, A.J., Lienemann, M., Brandle, J.E., Linder, M.B. & Menassa, R. 2010. Hydrophobin fusion for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. Plant Physiol. Vol. 152, s. 622–633.
- 70 Proteiinien koon määrittäminen sekvenssin perusteella. ExPASy ProtParam. Verkkodokumentti.< <http://web.expasy.org/protparam/> >. Luettu 4.8.2013.
- 71 Kim, M., Elvin, C., Brownlee, A. & Lyons, R. 2007. High yield expression of recombinant pro-resilin: Lactose-induced fermentation in *E. coli* and facile purification. Protein Expression & Purification. Vol. 52(1), s. 230–236.
- 72 Charati, M.B., Ifkovits, J.L., Burdick, J.A., Linhardt, J.G. & Kiick, K.L. 2009. Hydrophilic elastomeric biomaterials based on resilin-like polypeptides. Soft Matter. Vol. 5, s. 3412–3416.

Affiniteettikromatografia ajot DBCD-resiliini-HFBI ja DSCBD-resiliini-HFBI-ER

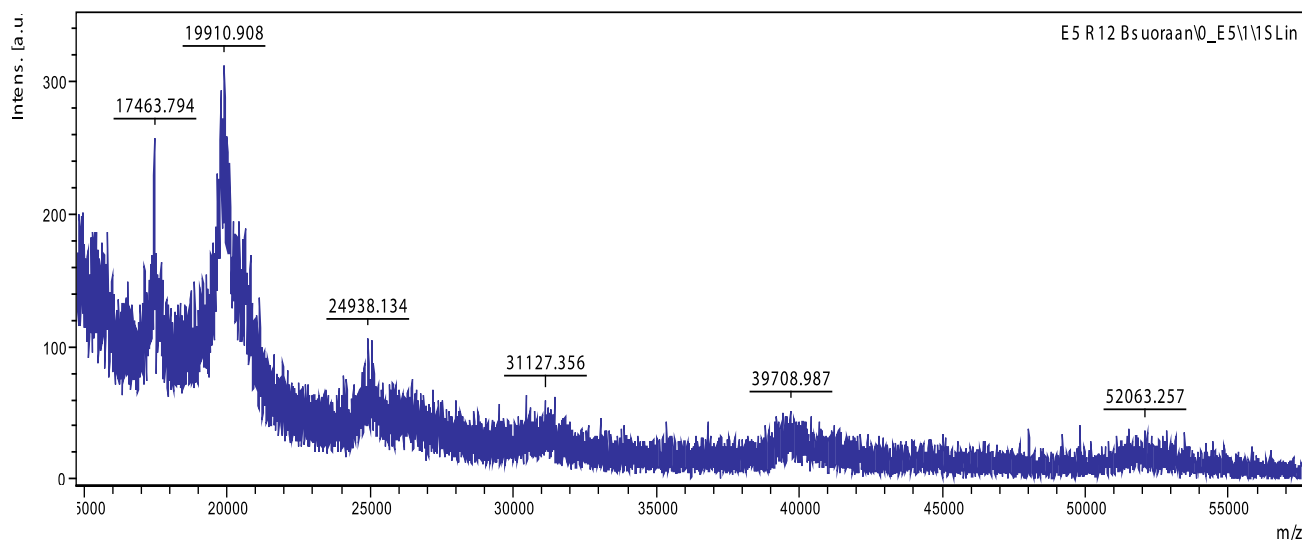
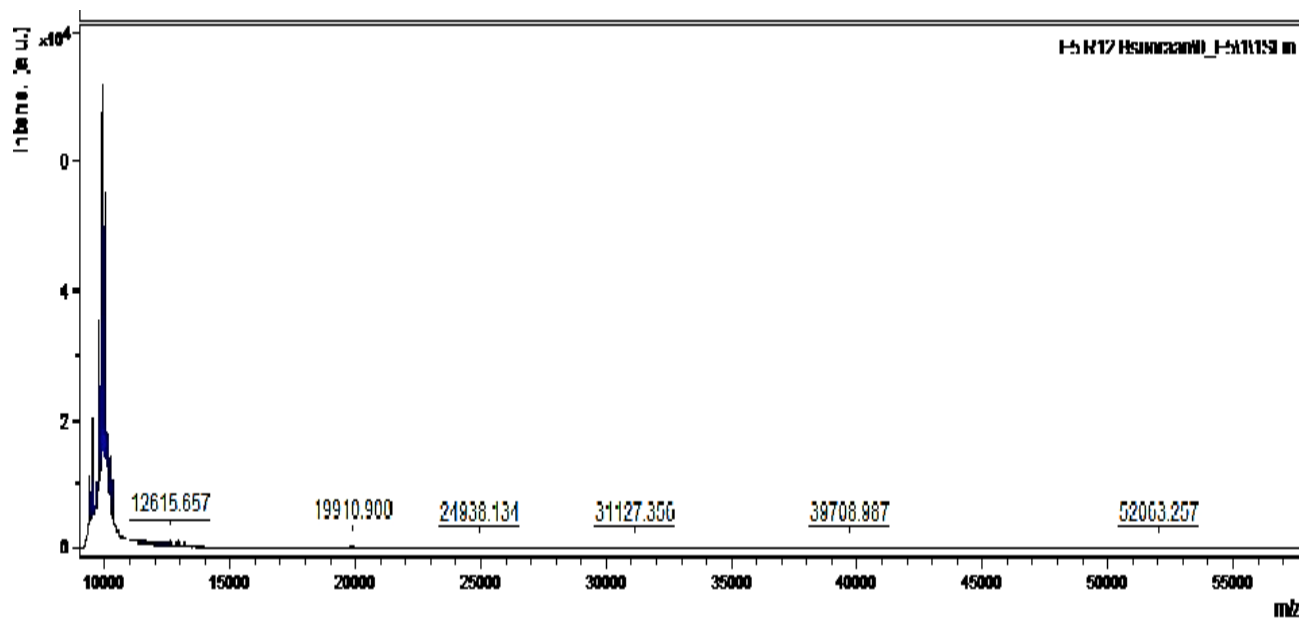


Kuva 1. Affiniteettikromatografia, Strep-trap HP 5 ml -pylväs (GE Healthcare). Solun ulkopuolelle erittyvästi tuotetun DCBD-R-HFBI-proteiinin (350 ml:n kasvatuksesta 40 ml kasvatusta) puhdistusajo. A 280 nm on kuvattu vihreällä värillä.



Kuva 2. Affiniteettikromatografia, 1 ml:n Strep-tactin (IBA) pylväs, sisäisesti tuotetun DCBD-R-HFBI-ER-proteiinin (puolet 4 g:sta hajotettua ja +65 °C:ssa käsitellyn myseeliin liukoista proteiinia) puhdistusajo. A 280 nm on kuvattu vihreällä värillä.

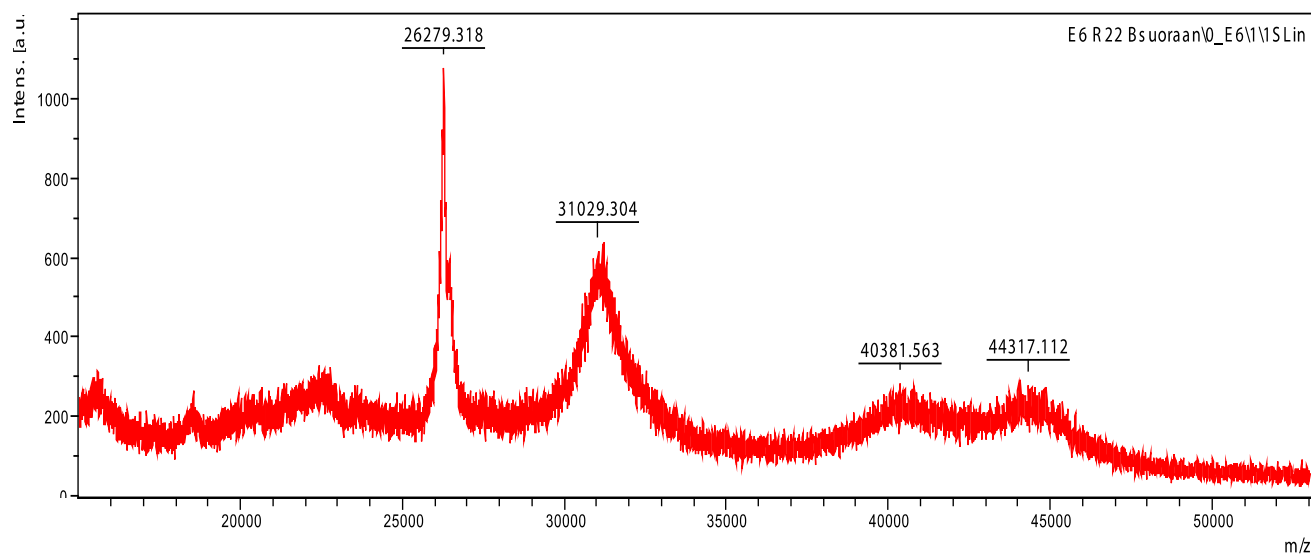
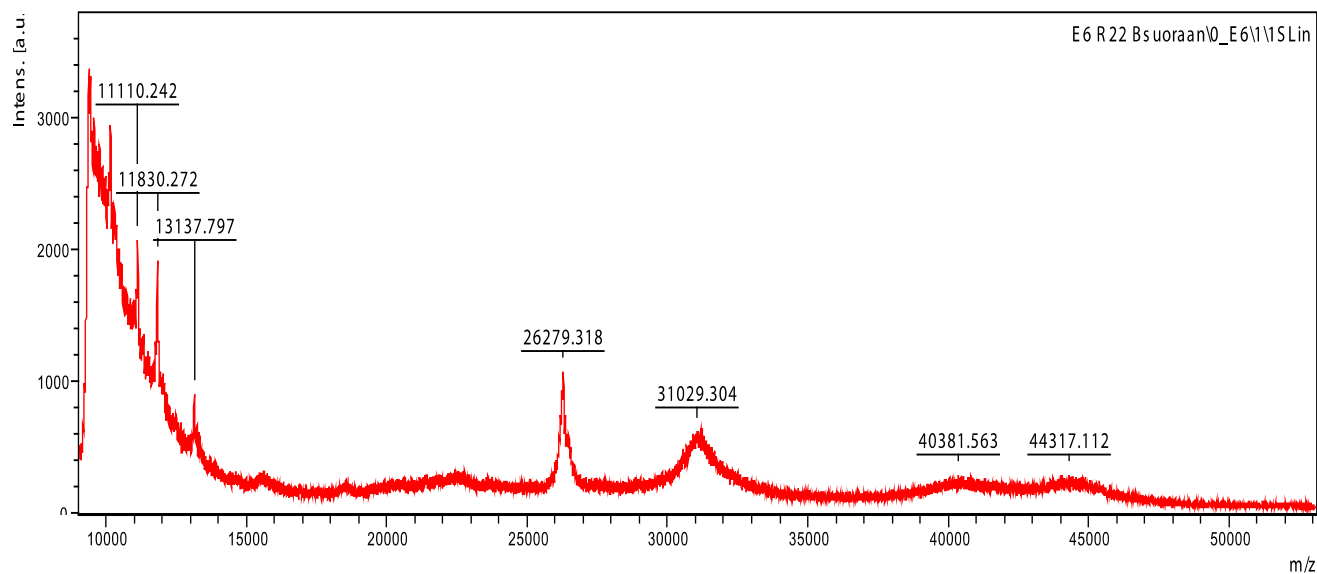
MALDI ajo DCBD-resiliini-HFBI-ER



R12
m/z

9389,938	9900,37	10216,92	13188,88	31127,36
9518,687	9997,134	10325,18	17463,79	39708,99
9771,324	10014,04	12615,66	19910,91	52063,26
9883,568	10108,24	12953,39	24938,13	

MALDI ajo DCBD-resiliini-HFBI



R22

m/z

9473,499 11830,27 22426,97 40381,56

10118,32 13137,8 26279,32 44317,11

11110,24 18559,59 31029,3